MEMBRANPOTENTIAL UND IONENMILIEU DER ZELLWAND IM EXTENSOR DES LAMINARGELENKS VON PHASEOLUS COCCINEUS L.: FUNKTION UND BEDEUTUNG BEI CIRCADIANEN VOLUMENÄNDERUNGEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

CRESCENTIA FREUDLING

aus Frauenzell

~~1984~~
1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0008

MEMBRANPOTENTIAL UND IONENMILIEU DER ZELLWAND IM EXTENSOR DES LAMINARGELENKS VON PHASEOLUS COCCINEUS L.: FUNKTION UND BEDEUTUNG BEI CIRCADIANEN VOLUMENÄNDERUNGEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
CRESCENTIA FREUDLING
aus Frauenzell

1984

Tag der mündlichen Prüfung	12.Dezember 1983
Dekan	Professor Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter	Privatdozent Dr. D. Gradmann
2. Berichterstatter	Professor Dr. A. Hager

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Erklärung häufig verwendeter Symbole und Abkürzungen 1
2. Einleitung 3
2.1. Problemstellung 3
2.2. Eigenschaften pflanzlicher Zellwände 6
3. Material und Methoden 11
3.1. Versuchsobjekt und Anzucht 11
3.2. Registrierung der circadianen Blattbewegung 11
3.3. Elektrische Membranpotentialmessungen 11
3.3.1. Vorbereitungen 11
3.3.2. Elektrische Meßeinrichtung 13
3.4. Ionenaustauschexperimente 14
3.4.1. Flußexperimente mit Radioisotopen 14
3.4.1.1. Durchführung von Flußexperimenten 14
3.4.1.2. Effluxanalyse 18
3.4.2. K^+- und Na^+-Auswaschexperimente durch Kationenaustausch; photometrische Ionenkonzentrationsbestimmung 19
3.4.2.1. Versuchsbedingungen und Versuchsdurchführung 20
3.4.2.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung 22
3.4.2.3. Berechnung des Kationengehalts der Zellwand aus der Auswaschkinetik 22
3.4.2.4. K^+-Flüsse über das Plasmalemma 25
3.4.2.5. Optimierung des Auswaschmediums 26
3.4.2.5.1. Ionenspezies 26
3.4.2.5.2. Osmolarität 27
3.5. Zellwandvolumenbestimmung mit ^{14}C-Inulin 31
4. Ergebnisse 32
4.1. Membranpotentialmessungen an Querschnitten aus dem Blattgelenk 32
4.1.1. Membranpotentialmessungen an frischen Schnitten aus dem Blattgelenk in verschiedenen Phasen der circadianen Blattbewegung 32
4.1.1.1. Membranpotential der Extensorzellen in S_1 in Abhängigkeit von der Bewegungsphase der Blätter 33
4.1.1.2. Durch CN^- ausgelöste Depolarisierung des Ruhepotentials in Abhängigkeit von der Bewegungsphase der Blätter 37

4.1.1.3. Änderung des Ruhepotentials durch Veränderung der K^+-Konzentration in der Badelösung in Abhängigkeit von der Bewegungsphase der Blätter 40
4.1.1.4. Potentialänderungen bei frischen Schnitten durch Licht-aus/Licht-an Reize 42
4.1.1.5. Extensorzellwandpotential bei frischen Schnitten in Abhängigkeit von der Bewegungsphase der Blätter 43
4.1.2. Membranpotentialmessungen an 24 h lang "gealterten" Schnitten 45
4.2. Flußexperimente mit Radioisotopen 53
4.2.1. Efflux von $^{36}Cl^-$ 53
4.2.2. Influxkinetik von $^{36}Cl^-$ in das Extensor- und Flexorgewebe via Transpirationsstrom 59
4.2.3. Cl^--Konzentrationen in der Extensor- und Flexorzellwand? 63
4.2.4. Weitere, Aktivität abgebende Kompartimente beim $^{36}Cl^-$-Efflux 64
4.2.5. Efflux von $^{86}Rb^+$ 65
4.3. Kationengehalt der Extensorzellwand 70
4.3.1. Beispiele für Auswaschkinetiken 70
4.3.2. In situ K^+-Gehalt der Extensorzellwand im Tagesgang der Blattbewegung 72
4.3.3. K^+-Gehalt der Zellwand nach 1,5 h Inkubation der Extensorschnitte 77
4.3.4. K^+-Flüsse über das Plasmalemma nach außen 83
4.4. Zellwandvolumen nach der ^{14}C-Inulin-Methode 84
5. Diskussion 87
5.1. Elektrische Experimente 87
5.1.1. Es ist problematisch, an herausgeschnittenem Blattgelenksgewebe Potentialmessungen zu machen in der Absicht, in situ Verhältnisse zu erfassen! .. 87
5.1.2. Gleichgewichtspotentiale bei frischen Schnitten und Membranleitfähigkeitsänderungen während des Alterns von Schnitten 91
5.1.3. Elektrisches Verhalten gealterter Schnitte und deren Ähnlichkeit mit in situ Gewebe 96
5.1.4. Elektrisches Verhalten frischer Schnitte 100

5.2. Ionenaustauschvorgänge 104
5.2.1. Aufladevorgänge und Auswaschexperimente mit Radioisotopen 104
5.2.1.1. Steady-state während der radioaktiven Aufladung in situ contra non-steady-state während der Auswaschexperimente in frischen Schnitten 104
5.2.1.2. Identifizierung der schnellsten Komponente 1 bei $^{36}Cl^-$-Auswaschversuchen ist schwierig. 106
5.2.1.3. $^{86}Rb^+$ als Tracer der verschiedenen Kationen der Auswaschlösung 108
5.2.1.4. Zellwandvolumen nach der ^{14}C-Inulin-Methode 109
5.2.2. Kationengehalt der Zellwand in situ im circadianen Rhythmus 110
5.3. Schlußfolgerungen, Konzept zum Mechanismus von Volumenänderungen pflanzlicher Zellen 115
5.3.1. Übereinstimmung mit Verhältnissen beim säureinduzierten Streckungswachstum? 115
5.3.2. Veränderte Neutralisation/Dissoziation der -COOH-Gruppen des DFS während der circadianen Blattbewegung und beim säureinduzierten Streckungswachstum 117
5.3.3. Modellvorstellung von Transportprozessen, die zu circadianen Volumenänderungen der Extensorzellen führen. 119
6. Anhang: Beobachtungen bei den elektrischen Messungen, die bisher ungeklärt sind, die aber nicht verlorengehen sollen. 122
7. Zusammenfassung 124
8. Literaturverzeichnis 127

1. Erklärung häufig verwendeter Symbole und Abkürzungen

A:	verwendete Lösung für Auswaschversuche mit entweder frischen oder 1,5 h lang inkubierten Schnitten
AWL	Auswaschlösung
AV	Apoplastenvolumen (µl)
c	Index zur Bezeichnung des Kompartiments Cytoplasma
$[c_i]$	Konzentration des Ions i
DFS	Donnan Free Space der Zellwand
E_{diff}	Diffusionspotential (mV)
E_i	Gleichgewichtspotential für das Ion i (mV)
E_m	Membranruhepotential (mV)
E_p	elektromotorische Kraft der elektrogenen Pumpe (mV)
Ex	Extensor
FG	Frischgewicht (mg)
FG - TG	Gewebewasser (µl)
Flex	Flexor
"frische" Schnitte	seit höchstens 1,5 h nach dem Schneiden in einer Badelösung liegend
"gealterte" Schnitte	seit ca. 24 h nach dem Schneiden in einer Badelösung liegend
g_i	elektrische Membranleitfähigkeit für das Ion i
g_p	elektrische Leitfähigkeit der elektrogenen Pumpe
I:	verwendete Lösung entweder für die "in situ Inkubation" via Transpirationsstrom oder für die Inkubation frisch gefertigter Schnitte
Indices	w Zellwand/Apoplast, c Cytoplasma, v Vakuole, sym Symplast

k	Reaktionskonstante, Geschwindigkeitskonstante (min^{-1})
LB	Leitbündelstrang bzw. Teile vom Leitbündel bei Tangentialschnitten
MWU Test	Mann Whitney U Test
n	Anzahl der Messungen, Meßwerte
S_1	10 mM KCl, 90 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$
1/10 S_1	1 mM KCl, 9 mM NaCl, 0,1 mM $CaCl_2$
S_2	1 mM KCl, 99 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$
$\longrightarrow$	z. B. $S_1 \rightarrow S_2$ Austausch einer Badelösung (S_1) gegen eine andere (S_2)
SF	Standardfehler, Standardabweichung/$\sqrt{n}$
sym	Index zur Bezeichnung des Symplasten
$t_{1/2}$	Halbwertszeit, $t_{1/2} = \ln 2/k$ (min, h)
τ	Zeitkonstante, $\tau = 1/k$ (min, h)
TG	Trockengewicht (mg)
v	Index zur Bezeichnung des Kompartiments Vakuole
w	Index zur Bezeichnung des Kompartiments Zellwand/Apoplast
WFS	Water Free Space der Zellwand

2. Einleitung

2.1. Problemstellung

Viele Pflanzen ändern im Tag-Nachtrhythmus die Stellung ihrer Blätter; Blüten öffnen und schließen sich. Wenn diese tagesperiodischen Schwingungen unter konstanten Bedingungen weitergehen mit einer Schwingungsdauer von ungefähr 24 Stunden, spricht man von einem endogenen, circadianen Rhythmus. Der beobachtete und gemessene Prozeß, z. B. die periodische Blattbewegung, wird dabei als Zeiger der zugrundeliegenden, steuernden biologischen Uhr angesehen.

Samanea (SATTER et al. 1982), Albizzia (SAXE, SATTER 1979), Trifolium (SCOTT et al. 1977), Oxalis (SKROVE et al. 1982), Mimosa (SAMEJIMA, SIBAOKA 1980) und Phaseolus (MAYER 1981) sind seit langem verwendete Pflanzenobjekte, um den zeitlichen Verlauf vieler Veränderungen im Blattgelenk im Hinblick auf den Mechanismus der Blattbewegung einerseits und den Mechanismus der circadianen Uhr andererseits zu untersuchen. Differentielle, circadiane Volumenänderungen von Zellen im Gelenk sind die Ursache der Bewegung.

Alle Untersuchungen dieser vorliegenden Arbeit wurden am Laminargelenk (Gelenk zwischen Blattstiel und Blattspreite) der Primärblätter der Bohnenpflanze Phaseolus coccineus L. durchgeführt. Das ganze Gelenk ist ca. 4 mm lang und 2,5 mm im Durchmesser. Es besteht aus einem zentralen Leitbündelstrang und Bewegungsgewebe, das ungefähr konzentrisch den Leitbündelstrang umgibt. Das Bewegungsgewebe auf der Gelenkunterseite wird Extensor genannt; diese Extensorzellen haben ein großes Volumen, wenn die Blätter für die Tagstellung angehoben sind, und sie verkleinern das Volumen beim Übergang in die Nachtstellung. Die Volumenänderungen der Zellen auf der der Gelenkoberseite, die Flexor genannt wird, verlaufen dazu antagonistisch. Die seitlichen Gewebeabschnitte im Gelenk werden als Flanken bezeichnet. Bei Samanea und auch bei Phaseolus ist nachgewiesen, daß schon Halbgelenke, die nur aus Extensor (oder Flexor) und seitlichem Flankengewebe bestehen, für das Zustandekommen der Blattbewegung genügen

(PALMER, ASPREY 1958; MAYER 1981). Eine bisher experimentell nicht bewiesene Vorstellung ist, daß mit den Volumenänderungen auch Turgoränderungen einhergehen oder diesen vorausgehen (erhöhter Turgor - größeres Zellvolumen).

Das Volumen der Zellen ändert sich, weil in einer Bewegungsphase K^+ und Cl^- als die wichtigsten Osmotika in die Zellen hineintransportiert werden und Wasser mitziehen, aber in einer anderen Bewegungsphase die Zellen K^+ und Cl^- wieder abgeben (MAYER 1977). Die treibenden Kräfte und der Mechanismus der Ionenaufnahme in die dadurch größer werdenden Zellen bzw. die Ursache einer Nettoabgabe von Osmotika aus den Zellen in den aufeinanderfolgenden Bewegungsphasen sind bei Phaseolus nicht bekannt. Eine aktive K^+-Akkumulation in den Zellen gegen den Konzentrationsgradienten wird nicht mehr vermutet (GRADMANN, MAYER 1977). Bei Samanea wird angenommen, daß als erstes eine Protonenpumpe im Plasmalemma einen elektrischen und einen Protonenkonzentrationsgradienten über der Membran aufbaut, die die Cl^--Aufnahme über ein 2 H^+/Cl^--Cotransportsystem energetisieren (SATTER, GALSTON 1981; CAMPBELL et al. 1981). Die K^+-Aufnahme soll dabei über ein H^+/K^+-Austauschsystem erfolgen. Auch bei den Schließzellen, deren Volumenänderungen zum Öffnen und Schließen der Stomata führen, wird aktiver Transport von Protonen als der primäre Transportschritt vermutet, dem andere Prozesse wie die K^+- und Cl^--Aufnahme in die Zellen bzw. die Malatsynthese in den Zellen nachgeordnet sind (RASCHKE 1979; ZEIGER 1983).

In dieser Arbeit wurde versucht, bei Phaseolus mit elektrophysiologischen Methoden der Membranpotentialableitung elektrische Membranparameter zu bestimmen: die Höhe des Membranpotentials, möglicherweise circadiane Schwankungen im Membranpotential, die Beteiligung und den Beitrag von passivem und aktivem Ionentransport zum Membranpotential von aus dem Gelenk isolierten und in einer konzentrierten Badelösung inkubierten Gewebeschnitten. Es ist bekannt, daß das Membranpotential von Zellen isolierter Trifolium- und Samanea-Blattgelenke im Tagesgang der Bewegung sich ändert (SCOTT et al. 1977; RACUSEN, SATTER 1975; RACUSEN, GALSTON 1977).

Es scheint aber grundsätzlich fragwürdig, ob elektrische Meßergebnisse an isolierten Gelenkteilen die elektrischen Verhältnisse in situ im Tagesgang wiedergeben. Der Vergleich von Potentialmessungen an frisch gefertigten Schnitten und an 24 h lang in der Badelösung gealterten Schnitten ermöglicht hierzu eine erste, klare Antwort.

Um herauszufinden, ob die Ionenverschiebung vom Extensor zum Flexor und vice versa über symplastischen oder apoplastischen Transport erfolgt und welche Triebkräfte für die Ionenaufnahme in die Zellen bzw. die Ionenabgabe verantwortlich sind in situ bei apoplastischem Transport, und um die Ergebnisse der Potentialmessungen sinnvoll zu ergänzen, wurde die Methode der Compartmentanalyse zur Ionengehalts-/Ionenkonzentrationsbestimmung in den einzelnen Kompartimenten des Gelenkgewebes angewandt: Zellwand, Cytoplasma und Vakuole wurden über den Transpirationsstrom mit radioaktivem $^{86}Rb^{+}$ und $^{36}Cl^{-}$ aufgeladen, und anschließend wurden die radioaktiven Ionen wieder unterschiedlich schnell aus den Kompartimenten ausgewaschen. Eine andere, von der Effluxanalyse abgeleitete Auswaschmethode wurde benützt, um festzustellen, welche Kationen natürlicherweise und in welcher Menge in der Zellwand vorkommen und ob der Kationengehalt der Zellwand in situ sich circadian ändert. Im Vergleich mit Ergebnissen von Schnitten, die in Badelösungen unterschiedlichen pHs mit oder ohne den Ca^{2+}-Komplexbildner EGTA inkubiert lagen, was schließlich die Bestimmung der maximalen negativen Festladungsmenge ermöglichte, können die Kationengehalte der Zellwand in situ auf sicherer Basis diskutiert werden. Um eine Vorstellung von den Ionenkonzentrationen in der Zellwand in situ in verschiedenen Bewegungsphasen zu bekommen, wurden die Wandvolumina mit radioaktiv markiertem Inulin bestimmt.

Wie und ob die Versuchsergebnisse auch das Verständnis und das Wissen von der Wirkungsweise der biologischen Uhr erweitern können, steht in dieser Arbeit nicht im Vordergrund. Modellvorstellungen von der biologischen Uhr weisen den Zellmembranen eine zentrale Rolle zu (ENGELMANN, SCHREMPF 1980). Experimentelle Befunde dafür sind z. B., daß Inhibi-

toren der mitochondrialen ATP-Synthese wie Cyanid, Azid oder 2,4-Dinitrophenol (DNP), wenn sie pulsförmig verabreicht werden, die Phase der Uhr stabil verschieben (MAYER 1981; STEINHEIL 1969; HASTINGS 1960) und daß Vanadat als Inhibitor protonentranslozierender ATPasen von äußeren Membranen eukaryotischer Zellen die Phase der Uhr beeinflußt (ECKHARDT 1982). Auch Diethylstilböstrol (DES) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD), zwei Hemmstoffe der H^+-Pumpe am Plasmalemma, verhindern bei Neurospora die durch Licht auszulösenden Phasenverschiebungen der circadianen Konidienbildung (NAKASHIMA 1982). Von allen soeben genannten Chemikalien ist aus elektrophysiologischen Experimenten der hemmende Einfluß auf elektrogene Ionenpumpen am Plasmalemma bekannt.

2.2. Eigenschaften pflanzlicher Zellwände

Weil die Zellwand in den weiteren Ausführungen eine sehr wichtige Rolle spielt, werden in diesem Abschnitt die elektrochemischen Eigenschaften pflanzlicher Zellwände zusammenhängend beschrieben (DAINTY, HOPE 1959; DAINTY et al. 1960; MORVAN et al. 1979; DEMARTY et al. 1980; SENTENAC, GRIGNON 1981).

Unter den Komponenten, die die pflanzliche Zellwand aufbauen, spielen Polygalakturonsäuren und Proteine eine sehr wichtige Rolle. Denn diese Moleküle haben Carboxylgruppen, die schwach sauer sind, deren Säure/Base-Gleichgewicht also vom pH, der Ionenstärke und der Ionenspezies der umgebenden Salzlösung abhängig ist. Daraus folgen wichtige Eigenschaften: Als schwache Säuren sind die -COOH-Gruppen zusammen mit den löslichen K^+- und Ca^{2+}-Salzen gute Puffer für H^+- und OH^--Ionen. Gleichzeitig haben sie Kationenaustauschereigenschaften; das bedeutet, daß z. B. Al^{3+} vor Ca^{2+} bevorzugt gebunden wird, ebenso Ca^{2+} bevorzugt vor K^+ und Na^+ und daß alle genannten Kationen H^+ aus der -COOH-Bindung verdrängen können. Außerdem können sich in der Zellwand, wo diese negativen Ladungen des Makromoleküls fixiert (unbeweglich) und hochkonzentriert vorliegen - abgesättigt durch Kationen - ,

nur wenig andere mobile Anionen wie z. B. Cl^- aufhalten (Ausschluß von Anionen). Der beträchtliche Ionenkonzentrationsunterschied, der zwischen Zellwand und umgebendem Medium wegen der hochkonzentrierten Festladungen entsteht (Kationen als ladungsausgleichende Gegenionen höher konzentriert in der Zellwand, mobile Anionen wegen erfolgreichem Ausschluß aus der Zellwand höher konzentriert im physiologischen Medium), ist die Ursache eines Diffusionspotentials zwischen Zellwand und Medium (Donnanpotential der Zellwand; Zellwand auf negativem Potential).

Drei im folgenden zitierte, experimentelle Ergebnisse führten zu der Erkenntnis, daß die Zellwand doch kein ideales Donnansystem ist, und zu der Vorstellung, daß sie sich aus Donnan Free Space und Water Free Space zusammensetzt (BRIGGS et al. 1958; DAINTY, HOPE 1959):

- In der Zellwand übersteigt die Menge an austauschbaren Kationen die Menge an austauschbaren Anionen (radioaktive Tracerstudien mit $^{86}Rb^+$ und $^{131}J^-$). Das "extraaustauschbare Rb" wird benützt zur Abschätzung der fixierten Anionen in der Zellwand.
- Im Gleichgewicht ist die Konzentration von beweglichen Anionen in der Zellwand viel höher, als es die Theorie für eine homogene Donnanphase voraussagt.
- Der Gehalt an austauschbarem Jodid in Zellwänden von Chara steigt linear mit der Jodidkonzentration in der Badelösung an.

DAINTY und HOPE (1959) sehen die Zellwand als System aus Makroporen und Mikroporen: die Makroporen mit einem Durchmesser > 10 nm, ungeladen und deswegen für Kationen und Anionen gleich zugänglich; die Mikroporen mit einem Durchmesser ≤ 10 nm, mit hoher negativer Ladungsdichte, die Kationen anzieht - wie gesagt, zweiwertige Kationen vor einwertigen bevorzugt - und Anionen ausschließt. In diesem Verbund aus geladenen und ungeladenen Poren ergeben alle Mikroporen den Donnan Free Space (DFS) und alle Makroporenräume zusammen den Water Free Space (WFS). Zum WFS gehören bei Gewebeschnitten auch die mit Lösung angefüllten Interzellularräume, die

im intakten Gewebe mit Gas gefüllt sind, sowie die angeschnittenen, zerstörten Zellen an den Schnitträndern (PITMAN et al. 1974; BRIGGS et al. 1961).

Daß die Terme DFS und WFS nur quantitative Bedeutung haben bei einer ganz bestimmten Ionenkonzentration, Ionenspezies bzw. Ionenzusammensetzung der Badelösung, ist zur gleichen Zeit schon erkannt worden (DAINTY et al. 1960) und wird berücksichtigt in einem mathematischen Modell der Zellwand als ein System von "electric double layers" (DAINTY, HOPE 1961). Dabei ist das Wichtigste, daß es zwischen DFS und WFS keine scharfe, strenge Grenze gibt, daß der Abstand zwischen den elektrisch geladenen Schichten nur von der Konzentration und Wertigkeit der Ionen der Badelösung und nicht von der Oberflächenladungsdichte abhängt und daß infolge dieser Abhängigkeit das apparente Volumen des DFS mit steigender Salzkonzentration der Badelösung außen abnimmt, was eine Zunahme der apparenten Konzentration der negativen Festladungen bedeutet.

Diesem Bild der Zellwand aus ungeladenen Makroporen und geladenen Mikroporen wird 20 Jahre später ein anderes Modell gegenübergestellt, das sie als homogene Phase sieht, die einen Polyelektrolyten (Polygalakturonsäure), ein- und zweiwertige Kationen (K^+, Ca^{2+}) und Cl^--Anionen enthält (DEMARTY et al. 1980). Die elektrostatischen Wechselwirkungen dieser vier Ionenspezies werden dabei so beschrieben, daß eine Phase mit gleichförmig verteilten negativen Festladungen die charakteristischen Eigenschaften von DFS und WFS in sich vereinigt. Als Polyanion mit hoher Ladungsdichte ist die Zellwand ein hervorragender Kationenpuffer; d. h. sie kann große Mengen/Konzentrationen an Kationen aufnehmen mit dem Vorteil, daß deren Aktivität wegen der Kondensation ins Polyanion viel geringer ist als die tatsächliche Konzentration. Die Kationen und fixierten Anionen behalten trotzdem die Ladung (bleiben ionisiert), sind aber undissoziiert. Daß die Konzentration der Kationen auf eine 10fach niedrigere Aktivität gemindert wird wegen der starken Wechselwirkung mit dem Polyanion, ist scheinbar eine realistische Abschätzung (ETHERTON

1980). Meine eigene Vorstellung/Antwort auf die Frage, was "sieht" das Plasmalemma, ist in 5.1.2. dargestellt.

Welche Menge an negativen Festladungen in dieser Einheit aus Polyelektrolyt und beweglichen Ionen vorliegt, hängt vom pH-Wert, der Ionenstärke und der Ionenzusammensetzung (ein- und/oder zweiwertige Kationen) des umgebenden Bademediums ab (MORVAN et al. 1979). Je höher der pH der Lösung, desto mehr -COOH-Gruppen sind dissoziiert. Zwischen pH 3 und pH 5 wird sowohl in Zellwänden von Chara wie auch im Free Space von Rote Beete-Gewebeschnitten die Menge der maximal induzierbaren Festladungen von ungefähr 10 % auf ungefähr 90 % erhöht, ermittelt als Menge an austauschbarem K^+ bzw. Na^+ in der Zellwand in Abhängigkeit vom pH außen in der Lösung (DAINTY et al. 1960; PITMAN 1965). Bei pH-Werten größer als 6 sind alle -COOH-Gruppen dissoziiert. Der pH-Wert der Lösung, bei dem die halbmaximale Dissoziation der fixierten Säuregruppen erreicht wird, ist nicht konstant, sondern hängt streng von der Ionenstärke und der Zusammensetzung der verwendeten Lösung ab (PITMAN 1965; MORVAN et al. 1979). Je größer die Ionenstärke der Lösung ist, desto niedriger ist der pH-Wert, bei dem die Hälfte der Säuregruppen protoniert bzw. dissoziiert vorliegt . Denn eine hohe Salzkonzentration reduziert die Aktivität von Protonen. Ebenso bewirken Ca^{2+}-Ionen (im Vergleich mit Alkaliionen), daß der Wendepunkt der Titrationskurven zu einem niedrigeren pH-Wert verschoben wird (MORVAN et al. 1979). Diese relative Selektivität der fixierten Anionen für die verschiedenen Kationen wird damit erklärt, daß eine starke elektrostatische Interaktion die relative Säurestärke der Carboxylgruppen erhöht.

Theoretisch sollte die Zellwand als Donnansystem (unbewegliche Anionen, bewegliche Kationen) ideale Donnanpotentiale und ideale Potentialänderungen um 58 mV bei 10facher Änderung der einwertigen Kationenkonzentration in der Badelösung zeigen (HELFERICH 1959). Ca^{2+}-gesättigte Wände sollten entsprechend nur die Hälfte der Beträge liefern. DEMARTY et al. (1977) aber errechnen für Zellwände von Lemna große Abweichungen vom idealen Donnanpotential und überhaupt eine geringe Abhängigkeit des Wandpotentials von der Salzkonzentra-

tion außen. Und sie sehen wohl richtigerweise den Grund darin, daß die Menge an Festladungen und die Menge der sie absättigenden Gegenionen in der Zellwand wegen der Versuchsbedingungen nicht konstant bleiben. Im Gegensatz dazu zeigen Zellwände von intakten Schließzellen in 1 - 800 mM KCl-Lösungen ein ideales Donnanverhalten (SAFTNER, RASCHKE 1981). Alle bei diesen Versuchen verwendeten Lösungen waren bei pH 7 gepuffert, und vermutlich war deswegen die Menge der fixierten Festladungen konstant.

Für Zellen von Hefe ist wohlbekannt, daß vorhandene Oberflächenpotentiale starken Einfluß nehmen auf die Kinetik des Ionentransports der angrenzenden Membranen (BORST-PAUWELS 1981). Das heißt, daß die Anhäufung von Kationen und der Ausschluß von Anionen in der Nähe der Membran anstelle der gegebenen Ionenkonzentrationen der Badelösung berücksichtigt werden müssen. Änderungen der apparenten Dissoziationskonstanten von Bindungsstellen für Kationen und Anionen z. B. durch Erhöhung der Salzkonzentration im Bademedium werden durch eine Erniedrigung des Oberflächenpotentials erklärt. Wiederum wirken sich einwertige, zwei- oder gar dreiwertige Kationen unterschiedlich auf das Potential aus. An isolierten pflanzlichen Zellwänden ist ebenso angefangen worden, die Gleichgewichtskonzentrationen von Ionen in der Zellwand in Abhängigkeit vom pH, der Salzkonzentration und Kationenwertigkeit zu messen, in dem Wissen, daß diese lokalen Konzentrationen das Membranpotential und die Kinetik der Transportmoleküle bestimmen (SENTENAC, GRIGNON 1981).

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsobjekt und Anzucht

Bohnenpflanzen der Art Phaseolus coccineus L., Sorte Preisgewinner (Hild, Marbach), wurden im Gewächshaus des Botanischen Instituts im Lichtdunkelwechsel (7.30 Uhr - 16.30 Uhr Tageslicht, die restliche Zeit Dunkel) bei einer Temperatur von 23° C und bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 % von Samen bis zur Pflanze mit voll ausgebildeten, circadian schwingenden Primärblättern herangezogen. Als Zusatzbeleuchtung zum Tageslicht dienten Leuchtstoffröhren vom Typ Osram-L-Fluora 65 W/77 R. Nur Laminargelenke (zwischen Blattstiel und Primärblatt) von 3 - 4 Wochen alten Pflanzen wurden für die Versuche verwendet.

3.2. Registrierung der circadianen Blattbewegung

Die Pflanzen wurden bei Tageshelle vom Lichtdunkelwechsel des Gewächshauses in einen Konstantraum getragen, in dem über Tage hinweg kontrolliert konstante Dauerlicht- und Temperaturbedingungen waren (Licht ca. 4000 lx in der Höhe der Blätter, Temperatur 23° C, relative Luftfeuchtigkeit 55 %). Dort wurde die Bewegung der Primärblätter, deren Blattstiele in einem Winkel von 135° zur Sproßachse hin fixiert waren, in der althergebrachten Weise von Kymographen aufgezeichnet (HAUPT 1977).

3.3. Elektrische Membranpotentialmessungen

3.3.1. Vorbereitungen

In unterschiedlichen Bewegungsphasen der Blätter wurden in der Klimakammer aus einem Gelenk mit einem Handmikrotom zwei oder drei 150 µm dicke Querschnitte ungefähr aus der Gelenkmitte angefertigt (Abb. 1). Sie wurden mit Plastillin auf einem abgeschrägten Plexiglasklötzchen angeheftet. Der Flexor war immer nach oben gerichtet, um die natürliche Orientierung ungefähr beizubehalten. Die montierten Schnitte wurden

sofort in ein Becherglas mit der künftigen Meßlösung S_1 (10 mM KCl, 90 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$) gelegt und in einer belichteten kleinen Tragebox zur elektrischen Meßapparatur gebracht. So erhielten die frisch gefertigten Schnitte niemals Dunkelheit oder Schatten. Am Meßplatz wurde jeweils das Klötzchen mit dem Schnitt in eine Meßkammer (Abb. 2) gesteckt und mit geschmolzenem Wachs fixiert.

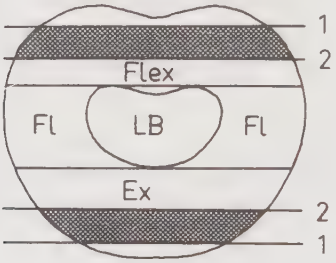

Abb. 1 Schematischer Querschnitt durch das Laminargelenk eines Primärblattes von Phaseolus coccineus L. (Ø ungefähr 2,5 mm).
Ex: Extensorgewebe auf der Gelenkunterseite
Flex: Flexorgewebe auf der Gelenkoberseite
LB: zentraler Leitbündelstrang
Fl: Flankengewebe auf beiden Seiten vom Leitbündelstrang
Die gepunkteten Flächen geben die Lage der tangentialen Längsschnitte durch Extensor und Flexor wieder.
1 erste Schnittführung, 2 zweite Schnittführung

Die Meßkammer war auf einem Objektträger aus Plastik fixiert (zum Hantieren auf dem Mikroskoptisch). Ein Deckglas bedeckte die ganze Kammer. Badelösung floß langsam, aber kontinuierlich durch die Meßkammer; überschüssige Badelösung wurde durch eine Wasserstrahlpumpe abgezogen. Das Volumen der Badelösung in der Meßkammer betrug ca. 0,4 ml. Wenn die Potentialmessungen innerhalb von 1,5 h nach dem Zeitpunkt des Schneidens an den Schnitten durchgeführt wurden, wird von "frischen

Schnitten" gesprochen; Schnitte, die vor der Messung ungefähr 24 h lang in S_1 in der Klimakammer inkubiert lagen, werden als "gealterte Schnitte" bezeichnet.

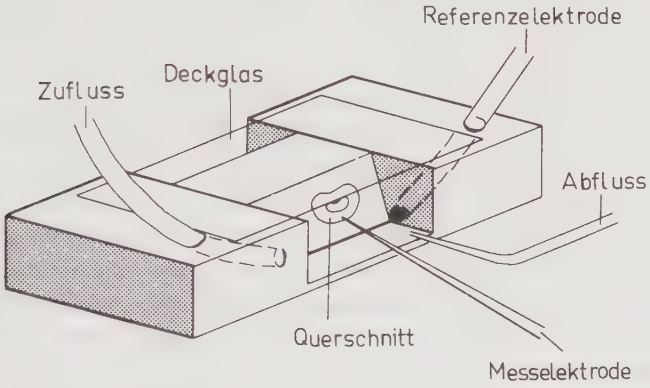

Abb. 2 Elektrische Meßeinrichtung für intrazelluläre Potentialmessungen.
In der Mitte ein abgeschrägtes Plexiglasklötzchen mit festgeheftetem Querschnitt aus dem Blattgelenk; darüber ein Deckglas; zum Betrachter hin bildet die Badelösung, die kontinuierlich ausgetauscht wird (zufluß, Abfluß über eine Wasserstrahlpumpe), einen vertikalen Meniskus; differente Meßelektrode; Referenzelektrode taucht in Badelösung.

3.3.2. Elektrische Meßeinrichtung

Die Membranpotentialmessungen erfolgten intrazellulär mit konventioneller Glasmikroelektrodentechnik. Selber gezogene Mikroglaspipetten (Vertical Pipette Puller 700 C, David Kopf Instruments; Borsilikatglas mit eingeschmolzenem Glasfaden, Hilgenberg) mit einem Spitzendurchmesser von ca. 1 µm wurden mit 3 M KCL-Lösung als Elektrolyt gefüllt (differente Elektrode). Die Referenzelektrode war ein nicht spitz ausgezogenes Glasröhrchen, das mit 3 % Agar in 3 M KCl-Lösung gefüllt war. Die eigentlichen Elektroden waren an einem Ende spitz auslaufen-

de, größere Glasröhrchen mit spiralig gewickeltem, chloriertem Silberdraht darin, der am anderen Ende des Röhrchens festgeklebt war (die Klebestelle verschließt zugleich das Glasröhrchen). Auch sie waren mit 3 M KCl-Lösung gefüllt.

Die differente Meßelektrode wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators (Leitz, Wetzlar) bei einer 200fachen Mikroskopvergrößerung in eine einzelne Zelle eingestochen, wobei meistens Zellen der äußersten, intakten Zellschicht ausgewählt wurden. Die Potentialdifferenz zwischen dieser intrazellulären Elektrode und der im Bademedium ableitenden Referenzelektrode wurde über einen Differenzverstärker dem Spannungsschreiber zugeleitet (Linear Abimed, Düsseldorf). Die Referenzelektrode lag auf Erde. Die Mikroskopbeleuchtung war von mittlerer Intensität und bei allen Versuchen gleich. Nur an Extensorzellen in der äußeren Extensorhälfte, zur Epidermis hin (Abb. 1), wurden Membranpotentiale abgeleitet. Es wurden nur Ableitungen ausgewertet, bei denen sich das Spitzenpotential der Meßelektrode nicht oder unwesentlich durch den Einstich verändert hatte (getestet nach dem Wiederherausziehen aus der Zelle).

3.4. Ionenaustauschexperimente*

3.4.1. Flußexperimente mit Radioisotopen

3.4.1.1. Durchführung von Flußexperimenten

Für die Untersuchung der Ionenverhältnisse in situ wurden die Gelenkgewebe über den Transpirationsstrom radioaktiv aufgeladen. Zunächst wurden die Primärblätter zusammen mit einem 6 cm langen Blattstiel von der Pflanze abgeschnitten und mindestens einen Tag lang im Lichtdunkelwechsel des Gewächshauses zur Erholung von der Schnittverletzung in Wasser gestellt.

* Sowohl die Flußexperimente mit Radioisotopen wie auch die in 3.4.2. beschriebenen K^+- und Na^+-Auswaschexperimente (mit anschließender photometrischer Ionenkonzentrationsbestimmung) beruhen auf dem Prinzip des Ionenaustauschs. Dabei wird ein Ion gegen ein anderes derselben positiven oder negativen Ladung ausgetauscht; z. B. ein radioaktives $^{36}Cl^-$-Ion gegen ein nicht radioaktives Cl^--Ion, ein $^{86}Rb^+$-Ion gegen ein K^+-Ion oder ein

Denn zusätzlich war auch noch die Blattspreite zur Verringerung der Transpiration um etwa ein Drittel reduziert worden. Daraufhin wurden im Isotopenlabor unter Dauerlicht (vier nebeneinander montierte Neonröhren, Philips TL 20 W/55) und bei konstanter Temperatur (ca. 23° C) die Blätter einzeln inkubiert. Dazu wurde der Blattstiel in ein Plexiglasröhrchen eben passender Weite gesteckt. Dieses Röhrchen steckte im Deckel eines Minivials (Zinsser, Frankfurt), das maximal 5 ml radioaktive Inkubationslösung (1 mM KCl, 9 mM NaCl, 0,1 mM $CaCl_2$ einschließlich Radioisotop = 1/10 S_1) fassen konnte. Radioaktives Medium konnte leicht nachgefüllt werden. Während der Inkubation wurde die Blattbewegung am Kymographen registriert. In bestimmten Bewegungsphasen und nach Ablauf gewünschster Inkubationszeiten wurde die Inkubation abgebrochen, das Gelenk herausgeschnitten und in ein Handmikrotom geklemmt. Aus dem Extensor und mit ca. 2 min Verzögerung auch aus dem Flexor wurde nach dem Wegschneiden einer Kuppe je ein Längsschnitt von 300 oder 400 µm Dicke angefertigt (Länge und Breite von der Gelenkgröße abhängig; Abb. 1). Jeder Schnitt gesondert wurde sofort ohne Abtupfen oder Abspülen in die bereits durchströmte Effluxküvette (Abb. 3) gelegt.

K^+-Ion gegen ein Li^+-Ion. Es ist wichtig, den Ionenaustausch an den fixierten negativen Festladungen in der Zellwand zu unterscheiden vom Austausch an Membranen, wo über die Plasmalemmamembran bzw. über den Tonoplasten z. B. für ein $^{36}Cl^-$, das abgegeben wird, ein nichtradioaktives Cl^--Ion aufgenommen wird. In der Zellwand ist vermutlich wie bei Ionenaustauschern der geschwindigkeitsbestimmende Schritt nicht die "chemische Austauschreaktion" an sich, sondern die Diffusion der die Plätze tauschenden Ionen (HELFERICH 1959). Die Phasengrenze zwischen dem Kompartiment Auswaschlösung und dem Kompartiment Zellwand stellt eine kleine Behinderung dar für die Diffusion der Ionen verglichen mit den Barrieren, die das Plasmalemma zwischen dem Kompartiment Zellwand und dem Kompartiment Cytoplasma und erst recht der Tonoplast zusätzlich zum Plasmalemma zwischen Vakuole und außen darstellen.

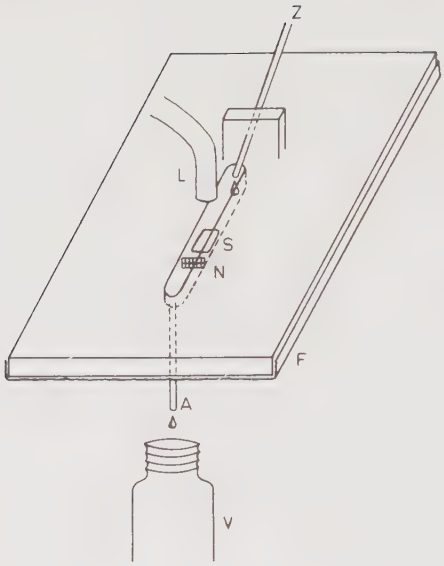

Abb. 3 Effluxvorrichtung bei Flußexperimenten mit Radiosisotopen.
V: Szintillationsfläschchen, Z: Zufluß des Auswaschmediums, A: Abfluß durch ein Glasröhrchen, S: Radioaktivität abgebender Extensor- oder Flexorschnitt, N: eingeklebtes Nylonnetz als Barriere für den Schnitt, F: zerknitterte Aluminiumfolie zur Lichtreflexion, L: Kaltlichtlampe (KL 150 B Schott, Mainz), Abstand ca. 2 cm vom Schnitt

Mit diesem Zeitpunkt startete das Effluxexperiment. Die Küvette war, wie in Abb. 3 dargestellt, eine in schräger Position festgeklemmte, kleine Plexiglasplatte mit einer eingebohrten Rinne (50 mm lang, 5 mm breit, 3 mm tief), in die der Schnitt gelegt wurde. Er wurde festgehalten durch ein eingeklebtes Nylonnetzchen; und um ihn und über ihn floß das nicht radioaktive Auswaschmedium. Der Meniskus des Auswaschmediums im 2 l Vorratsgefäß wurde konstant hochgehalten, da-

mit die Tropfgeschwindigkeit während des ca. zweistündigen Auswaschens etwa gleich blieb (26 - 46 Tropfen/min bei verschiedenen Versuchen). Das Medium floß aus der Rinne durch ein Glasröhrchen mit eingeschmolzenem Glasfaden stetig ab und wurde in Szintillationsfläschchen gesammelt. Für eine gute zeitliche Auflösung der Auswaschkinetiken wurden am Anfang des Experiments 15 sec-Intervalle eingehalten, später jedoch wurden die Fläschchen nach größeren Zeitintervallen ($\leq$ 10 min) weitergeschoben. Gleich nach Beendigung jedes Auswaschexperiments wurde das Frischgewicht der abgetupften Schnitte (Ermittlung der Restradioaktivität siehe unten) bestimmt und nach ungefähr halbtägigem Trocknen im Trockenschrank bei 70° - 80° C (mit oder ohne Vakuum) ebenso das Trockengewicht.

Die wegen kurzen und langen Sammelintervallen unterschiedlichen Volumina in den Szintillationsfläschchen wurden mit Auswaschmedium einheitlich aufgefüllt bis zum größten Volumen (längstes Zeitintervall) und dann mit Szintillator (Unisolve 100; Zinsser, Frankfurt) gemischt. So wurde der Quench konstant und durch geeignetes Verhältnis von wäßriger Phase und Szintillator auch niedrig gehalten. Die Aktivitätsmessung erfolgte in einem Liquid Scintillation Spectrometer (Modell 3385 Packard Tri-Carb). Die Einstellung für $^{86}Rb^{+}$ war: Fenster 50 - 1000; Verstärkung 1 - 2 %. Die für $^{36}Cl^{-}$ war: Fenster 50 - 1000; Verstärkung 2 %. Die Meßausbeute bei $^{86}Rb^{+}$ war 100 % (cpm = dpm), die für $^{36}Cl^{-}$ wurde über Vergleichsproben bekannter Aktivität zu 83 % bestimmt.

Die Messung der im Schnitt verbliebenen Restaktivität nach Abbruch des Effluxes konnte im Falle vom Rubidium direkt am ganzen Schnitt vorgenommen werden; im Falle vom Chlorid wurde der getrocknete Schnitt in Quarzsand zermörsert, dann wurde das zerriebene Gewebe samt Sand in einem kleinen Volumen Auswaschmedium ungefähr einen Tag lang inkubiert, um das $^{36}Cl^{-}$ zu extrahieren. Dann erst wurde die Restradioaktivität bestimmt.

3.4.1.2. Effluxanalyse

Das Verfahren der Compartmentanalyse ist bereits ausführlich beschrieben worden (CRAM 1968; HOPE 1971; WALKER, PITMAN 1976). Hier folgt nur eine knappe Beschreibung der Methode.

Die "von Hand"-Auswertung von Effluxkurven:

Vom Ende her (zeitlicher Ablauf des Auswaschexperiments) wird zur verbliebenen Restaktivität im Schnitt die in den einzelnen Fläschchen bestimmte Aktivität Schritt für Schritt dazuaddiert und der Betrag logarithmisch jeweils gegen die Auswaschzeit aufgetragen. Die auf diese Weise ermittelte Graphik der Gesamtauswaschkinetik (z. B. Abb. 18 a) gibt zu jedem Zeitpunkt, in dem die Fläschchen gewechselt wurden, die Menge der Aktivität im Schnitt an, die noch nicht ausgewaschen war.

Für ein System aus zwei oder mehr Kompartimenten in Serie ist diese Effluxkinetik zu Beginn nicht linear, geht dann aber bei genügend langer Auswaschzeit in eine Gerade über, welche das am langsamsten austauschende Kompartiment repräsentiert. Die Extrapolation dieser Geraden bis zum Zeitpunkt 0 min ergibt den Aktivitätsgehalt des Kompartiments. Wo die Gesamtkinetik von der Geraden abweicht, wird zu jedem Zeitpunkt die Differenz der Numeri zwischen der Originalkurve und der extrapolierten Geraden gebildet, d. h. von dem in den verschiedenen Kompartimenten enthaltenen Gesamtaktivitätsgehalt wird der Gehalt des langsamsten Kompartiments abgezogen. Durch erneutes Auftragen der ermittelten, verbleibenden Aktivitäten zu bestimmten Zeitpunkten und nochmalige Anwendung des Subtraktionsverfahrens wird die Gesamtkinetik graphisch zerlegt in die Einzelsummanden. Der Theorie nach sollten die auszuwaschenden Schnitte drei Kompartimente (drei Komponenten in der Auswaschkinetik), nämlich Zellwand w, Cytoplasma c und Vakuole v aufweisen, die exponentiell ihre Aktivität abgeben:

$$I(t) = I_w^o \cdot e^{-k_w \cdot t} + I_c^o \cdot e^{-k_c \cdot t} + I_v \cdot e^{-k_v \cdot t} \qquad \text{Gl. 1}$$

I_w^o, I_c^o und I_v^o sind die Aktivitätsgehalte der Kompartimente zur Zeit 0 min und k_w, k_c und k_v die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten für die Abgabe der Radioaktivität vom betreffenden Kompartiment nach außen. Alle sechs Parameter ergeben sich bei der graphischen Auswertung, die möglich ist, falls die k-Werte erheblich verschieden sind.

Auswertung von Effluxkurven mittels eines Computerprogramms:

Im Gegensatz zur Auswertung "von Hand", welche auf linearer Regression geeigneter Abschnitte der logarithmischen Effluxkurve "nach Augenmaß" beruht, können vom Computer mittels nichtlinearer Verfahren auch überall gekrümmte Kurven ausgewertet werden. Ein weiterer Vorteil der maschinellen Auswertung ist die Verwendung einer reproduzierbaren Gewichtung der Abstandsquadrate (beim Verfahren "von Hand" wird meist unbewußt und damit kaum reproduzierbar gewichtet). Für die Computerauswertung werden die Radioaktivitätsmengen in den einzelnen Fläschchen, die eingehaltenen Zeitintervalle und grobe Abschätzungen von I_w^o, k_w, I_c^o, k_c, I_v^o und k_v in den Computer eingegeben, der über ein Annäherungsprogramm die gesuchten Parameter der Funktion (Gl. 1) den Meßdaten genau anpaßt.

Das verwendete Programm trägt den Namen NL 2 SOL. Es wurde an der Universität Wisconsin-Madison, USA, entwickelt und vom Zentrum für Datenverarbeitung, Tübingen, käuflich erworben. Es verwendet einen für den Anwender recht komfortablen und sicheren, in der Literatur näher erläuterten Algorithmus (DENNIS et al. 1979).

3.4.2. K^+- und Na^+-Auswaschexperimente durch Kationenaustausch; photometrische Ionenkonzentrationsbestimmung

Die Entwicklung und Durchführung der hier beschriebenen Methode war zunächst mindestens deswegen nötig geworden, weil bei den oben genannten Versuchen mit Radioisotopen die Na^+-Verhältnisse in der Zellwand und in den zellulären Kompartimenten nicht gemessen worden waren. Die Methode hat den Vorteil, daß die in situ Ionenverhältnisse im Gelenk nicht durch eine radioaktive Inkubationslösung, die über den

Transpirationsstrom angeboten wird, verändert oder gestört werden. Schließlich wurden aber erst mit dieser Methode der K^+- und Na^+-Austauschexperimente die in situ Kationenverhältnisse in der Extensorzellwand in den verschiedenen Bewegungsphasen erfolgreich bestimmt. Aus der Austauschkinetik von frisch gefertigten Schnitten läßt sich der Gehalt an ausgetauschten Kationen in der Zellwand berechnen. Diese Bestimmung des Kationengehaltes ist nur für die Zellwand möglich und nicht für zelluläre Kompartimente, weil man bei der Auswertung den verzerrten Efflux aus dem Symplasten (non-steady-state!!) abzieht bzw. vernachlässigt.

3.4.2.1. Versuchsbedingungen und Versuchsdurchführung

Ausführlich werden die Anforderungen an ein geeignetes Auswaschmedium in 3.4.2.5. beschrieben. Die K^+-Auswaschlösung enthielt z. B. 200 mM LiCl und 50 mM NaCl, wenn frische Schnitte aus der Tagstellung ausgewaschen wurden; die Auswaschlösung für frische Schnitte aus der maximalen Nachtposition der Blätter war 150 mM LiCl und 50 mM NaCl. Wenn K^+ und Na^+ gleichzeitig ausgewaschen und nebeneinander bestimmt wurden, wurde mit 200 mM LiCl und 1 mM $CaCl_2$ (Tagstellung) bzw. mit 230 mM LiCl und 1 mM $CaCl_2$ (Nachtstellung) ausgewaschen.

Versuche mit frischen Schnitten:

Meistens wurden schnell nacheinander zwei, manchmal drei 300 µm dicke Extensortangentialschnitte aus zwei Gelenken für ein Auswaschexperiment frisch angefertigt (Abb. 1). Sie wurden sofort ca. 30 Minuten lang mit einem der oben genannten Medien ausgewaschen. Zwei Experimente liefen immer gleichzeitig, nur um einige Minuten versetzt. Die Küvetten glichen denen in Abb. 3. Nur waren beide Rinnen nebeneinander eingefräst in eine Plexiglasplatte, die schräg aufgeklebt die Decke eines Plexiglasbehälters bildete, der Eiswasser enthielt, das bei den Versuchen die Auswaschrinne und das zufließende Auswaschmedium in den Schläuchen auf ca. 0° C kühlte.

Die tiefe Temperatur wurde gewählt, um den Kationenaustausch am Plasmalemma sehr gering zu halten (BRIGGS et al. 1958). Der Austausch in der Zellwand sollte bei dieser Temperatur praktisch nicht beeinflußt sein.

Wieder, wie bei den Flußversuchen, rinnt das Medium über die in der Rinne liegenden Schnitte und tauscht K^+ (und Na^+) gegen Li^+ aus. Es fließt über ein Röhrchen stetig ab und wird in kleinen Plastikfläschchen gesammelt, die nach Zeitintervallen bestimmter, jedoch unterschiedlicher Länge gewechselt werden. Die Intervalle dauerten bei Beginn jeden Experiments 30 Sekunden, in der zweiten Hälfte des Experimnets z. B. 3 Minuten. Der Mediumfluß wurde von einer Peristaltikpumpe (Re Cy Chrom Type 4912 A LKB Produkter, Schweden) konstant in den Bereichen von 0,8 - 1,8 ml/min gehalten. Volumenkonstanz und genaue Kenntnis des Volumenflusses pro Zeit (durch Volumenbestimmung bei drei Fläschchen pro Experiment) sind notwendig für die rechnerische Auswertung der Auswaschkinetik. Die Beleuchtung bestand aus Tageslicht und Licht von zwei kurzen Neonröhren (Philips TL 20 W/55), die in ca. 40 cm Abstand von den Auswaschrinnen montiert waren.

Versuche mit inkubierten Schnitten:

Außer dem sofortigen Auswaschen von frisch angefertigten Schnitten wurden auch Auswaschexperimente an Schnitten durchgeführt, die nach dem Schneiden aus Tag- und Nachtstellung ca. 1,5 h lang unter dauerndem, sanftem Schütteln in folgenden Lösungen inkubiert lagen: i. 10 mM KCl, ungepuffert, pH um 6; ii. 10 mM KCl, 10 mM Tris·HCl, pH 8 - 9; iii. 10 mM KCl, 10 mM Tris·HCl, pH 8 - 9, 0,1 mM EGTA. Die Inkubation erfolgte bei Zimmertemperatur und bei der gleichen Beleuchtung wie während des Auswaschens. Das Inkubationsmedium wurde durchschnittlich fünfmal gewechselt. Anschließend wurden auch diese Schnitte wie beschrieben in der gekühlten Küvette ausgewaschen. Immer nach dem Auswaschen wurde das "Frischgewicht" der abgetupften Schnitte bestimmt und nach dem Trocknen über Nacht im Trockenschrank bei ca. 75° C auch das Trockengewicht der Schnitte.

3.4.2.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die durch den Ionenaustausch erhaltenen, unbekannten K^+- (und Na^+-)Konzentrationen in den einzelnen Fläschchen wurden anfangs nach der atomabsorptionsspektroskopischen Methode bestimmt; später wurde nur noch die Lichtemission der angeregten K^+- (und Na^+-)Ionen bestimmt. Denn beide Methoden erwiesen sich als gleich empfindlich (K^+-Linie bei 766,49 nm, 0,54 nm spektrale Bandbreite; Na^+-Linie bei 589,0 nm, 0,27 nm spektrale Bandbreite; Beckmann Atomic Absorption Spectrophotometer Modell 1271 Digital). Die unbekannten Kationenkonzentrationen der Fläschchen wurden über lineare Interpolation an jeweils neu aufgenommenen Eichkurven bestimmt. Die K^+- und Na^+-Eichlösungen wurden in der verwendeten Auswaschlösung angesetzt.

3.4.2.3. Berechnung des Kationengehaltes der Zellwand aus der Auswaschkinetik

Die ermittelten Konzentrationen werden logarithmisch und jeweils in der Mitte des Zeitintervalls gegen die Zeit aufgetragen. Man erhält eine Auswaschkinetik (Abb. 4), die trotz halblogarithmischer Auftragung für kleine t (Beginn des Experiments) nicht linear ist, sondern erst für große t in eine Gerade übergeht. Das bedeutet, daß auch diese Kinetik aus mindestens zwei Komponenten besteht (siehe 3.4.1.2.). Eine Komponente ergibt sich direkt aus dem linearen Verlauf der Kinetik bei größeren Zeiten (Symplast), die andere Komponente (Zellwand) wird rechnerisch ermittelt: Wie bei der radioaktiven Flußkinetik wird die Differenz der Numeri zwischen den Originalkonzentrationen und den extrapolierten Konzentrationen der Symplastkinetik zu verschiedenen Zeitpunkten gebildet. Die durch Subtraktion berechneten "Restkonzentrationen" werden erneut halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen und liegen auf einer Geraden, die den zeitlichen Verlauf des schnelleren Kationenaustausches in der Zellwand wiedergibt.

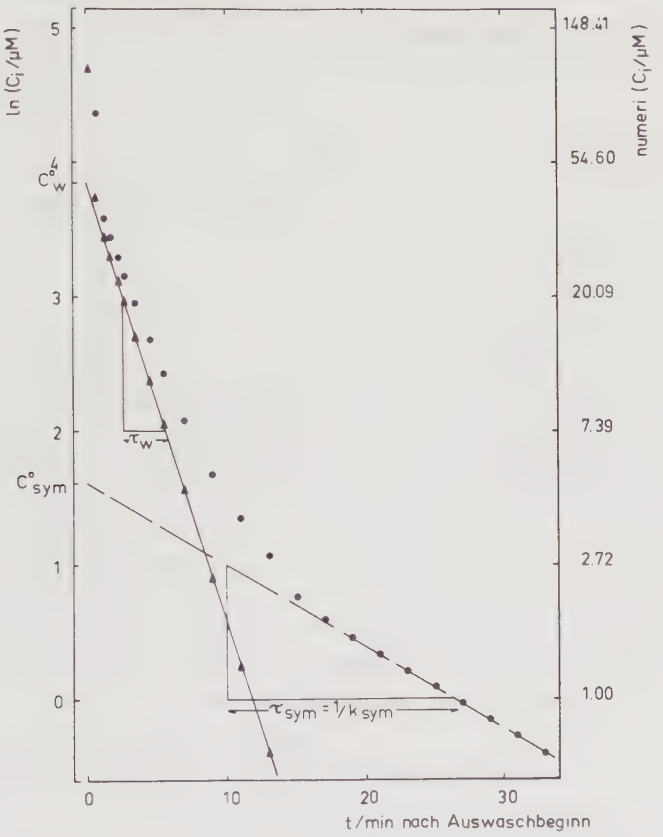

Abb. 4 Schemazeichnung einer Auswaschkinetik
Die Punkte (●—●) geben den zeitlichen Verlauf der Abnahme der K^+-Konzentrationen der gesammelten Eluate in halblogarithmischer Darstellung wieder. Die Gerade durch die Dreiecke (▲—▲) bekommt man dadurch, daß zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Differenz zwischen den Numeri der Originalkonzentrationen und den Numeri der Konzentrationen gebildet wird, die durch Extrapolation der Regressionsgeraden der Symplastenkinetik ermittelt werden. Die Zeitkonstanten der Ionenaustauschvorgänge, τ_w und τ_{sym} können direkt aus der Graphik bestimmt werden, bzw. sind die Reaktionskonstanten $-k_w$ und $-k_{sym}$ aus dem Rechnerprogramm für lineare Regression bekannt. C^o_w und C^o_{sym} sind die durch Extrapolation ermittelten Konzentrationen bei t = 0 min. Die Fläche unter den Geraden entspricht den aus den Kompartimenten ausgewaschenen Ionenmengen Q.

Die soeben beschriebene Gesamtkinetik ist die halblogarithmische Darstellung der exponentiell und gleichzeitig ablaufenden Kationenaustauschvorgänge in der Zellwand und am Plasmalemma.

$$C(t) = C_w^o \cdot e^{-k_w \cdot t} + C_{sym}^o \cdot e^{-k_{sym} \cdot t} \qquad \text{Gl. 2}$$

Nach Subtraktion der Symplastenkomponente verbleibt noch die Zellwandkomponente.

$$C_w(t) = C_w^o \cdot e^{-k_w \cdot t} \qquad \text{Gl. 3}$$

$C(t)$ ist die K^+-Konzentration im Fläschchen zu verschiedenen Zeitpunkten t. C_w^o und C_{sym}^o sind die infolge des Kationenaustausches in der Zellwand und am Plasmalemma erhaltenen, durch Extrapolation und Delogarithmieren ermittelten (getrennten) K^+-Konzentrationen in der Auswaschlösung zum Zeitpunkt t = 0 min. k_w und k_{sym} sind die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten. Zumindest die Konzentration des allerersten Intervalls zwischen 0 - 30 Sekunden liegt immer über der Konzentration, die sich graphisch durch die Gerade der Zellwandkinetik ergibt; der Grund ist vermutlich, daß auch alle angeschnittenen Zellen schnell ausgewaschen werden.

Bestimmung der insgesamt ausgetauschten K^+-Menge in der Zellwand:

Man integriert Gleichung 3 und multipliziert noch mit dem Auswaschvolumen/Zeit I (l/min) und erhält die gesamte, aus dem Zellwandkompartiment ausgewaschene K^+-Menge Q_w.

$$Q_w = I \int_{t_A}^{t_E} C_w^o \cdot e^{-k_w \cdot t} = \frac{I \cdot C_w^o}{k_w} \left(e^{-k_w \cdot t_A} - e^{-k_w \cdot t_E} \right) \qquad \text{Gl. 4}$$

Wegen t_A = 0 min (Startzeitpunkt des Experiments) wird $e^{-k_w \cdot t_A} = 1$. Der Term $e^{-k_w \cdot t_E}$ wird z. B. schon bei t_E = 5 min (ein wahrscheinlicher Endzeitpunkt des Austauschvorgangs in der Zellwand) viel kleiner als 1 ($e^{-0,90 \cdot 5} = 0,011$) und kann vernachlässigt werden. Es bleibt:

$$Q_w(\text{mol}) = I \cdot C_w^o \cdot \frac{1}{k_w} \left(\frac{1}{\text{min}} \cdot \frac{\text{mol}}{1} \cdot \text{min} \right) \qquad \text{Gl. 5}$$

Das Austauschvolumen I wird bei jedem Experiment bestimmt. C_w^o erhält man durch Extrapolation der Zellwandgeraden in der halblogarithmischen Darstellung, d. h. durch Berechnen der Regressionsgeraden und Ermitteln von Y' bei t = 0 min und anschließendes Delogarithmieren; $-k_w$ ist ebenfalls aus dem Regressionsprogramm bekannt.

Man erhält auf diese einfache Weise die gesamte K^+-Menge Q_w, die aus der Zellwand im Laufe von Minuten ausgetauscht/ausgewaschen wurde. Sie wird jeweils auf das Trockengewicht der im Experiment ausgewaschenen Schnitte bezogen. Denn circadiane Volumenänderungen der Extensorzellen manifestieren sich nur im Frischgewicht, nicht aber im Trockengewicht. Weil das Frischgewicht sich ändert, ist es keine geeignete Bezugsgröße.

3.4.2.4. K^+-Flüsse über das Plasmalemma

Um die Information, die in der Symplastenkinetik der Abb. 4 steckt, auszuwerten, wird die Gleichung für den Ionenfluß über das Plasmalemma nach außen

$$\phi_{sym} = k_{sym} \cdot Q_{sym} \left(\frac{\text{mol}}{\text{min}} \right) \qquad \text{Gl. 6}$$

benutzt als qualitatives Maß für die K^+-Flußverhältnisse während der ersten 30 Minuten nach dem Schneiden. Eine quantitative Analyse ist nicht angebracht, weil die steady-state-Bedingungen verletzt sind. k_{sym} ist wiederum die Geschwindigkeitskonstante der Ionenabgabe über das Plasmalemma; Q_{sym} kann auch nach Gleichung 5 in 3.4.2.3. berechnet werden. Der berechnete Fluß wird wiederum aufs Trockengewicht der ausgewaschenen Schnitte bezogen.

3.4.2.5. Optimierung des Auswaschmediums

Um die in der Zellwand enthaltenen Kationen - zu erwarten sind K^+, Na^+, Ca^{2+} und H^+ - auszuwaschen, war es notwendig, geeignete Auswaschlösungen zu finden, die folgende Bedingungen erfüllen:

1. Das auszutauschende Kation, z. B. K^+, durfte in der Auswaschlösung nicht enthalten sein.
2. Ein anderes Alkalisalz mußte verwendet werden, das möglichst wenig durch dieses zu bestimmende K^+ verschmutzt ist.
3. Die Konzentration des Auswaschmediums mußte so gewählt werden, daß möglichst kleine Volumenänderungen der Schnitte während des Auswaschvorgangs auftraten.
4. Hohe Konzentrationen von Erdalkaliionen waren ungeeignet wegen zu erwartender Auswirkungen auf die Plasmalemmamembran.
5. Eine geeignete Ionenzusammensetzung des Auswaschmediums schien wichtig zu sein für einen ungestörten K^+-Fluß über das Plasmalemma.

3.4.2.5.1. Ionenspezies

In Tab. 1 ist aufgeführt, wie stark einzelne Alkali- bzw. Erdalkalisalze, die in unserem Labor regelmäßig verwendet werden (Merck, Darmstadt), durch K^+, Na^+ oder Ca^{2+} verunreinigt sind. Es wird ersichtlich, daß sich RbCl in hoher Konzentration als K^+-Auswaschlösung nicht eignet. Weit besser sind die Salze LiCl, NaCl und $CaCl_2$. Zur Stabilisierung vom Plasmalemma muß Na^+ oder Ca^{2+} anwesend sein. Nur 10 mM RbCl z. B. bewirkt am Plasmalemma einen K^+-Austausch in Sprüngen (ähnlich der Kinetik in Abb. 5 b). Falls K^+ und Na^+ zusammen ausgewaschen und nebeneinander bestimmt werden sollen, eignet sich nur eine Mischung aus viel LiCl und wenig $CaCl_2$. CsCl wurde trotz der geringen Verunreinigung nie verwendet.

Der vorhandene geringe K^+- bzw. Na^+-Background wurde bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung berücksichtigt, indem die Eichlösungen in der verwendeten Auswaschlösung hergestellt wurden.

vorgegebene 100 mM Lösung	deren Gehalt in (µM) an: K^+	Na^+	Ca^{++}
LiCl zur Analyse	1	0.4	0
NaCl kristallin reinst	14.5	-	0
KCl reinst	-	5.8	-
RbCl kristallin	233	2.1	-
CsCl krist.	1	37.7	-
$SrCl_2$ zur Analyse	-	-	290
$MgCl_2$ zur Analyse	-	-	80
$LaCl_3$	-	-	86

Tab. 1 Verunreinigung der zum Auswaschen in Frage kommenden Salze durch K^+, Na^+ und Ca^{2+}.

3.4.2.5.2. Osmolarität

Bei den Versuchen stellte sich bald heraus, daß auch die verwendete Osmolarität eine entscheidende Rolle spielt. Bei geringer Osmolarität des Auswaschmediums, z. B. 20 mOsm wie in Abb. 5 a und b, dehnten sich die Schnitte in der Auswaschrinne aus und häufig krümmten sie sich. Dadurch änderte sich möglicherweise die Benetzung. Die Auswaschkinetik war oft deutlich gestört - es erschienen Plateaus oder Sprünge - und die Gesamtkinetik aus Zellwand und Symplast konnte im ersten Fall nicht in die zwei Komponenten aufgetrennt werden, im zweiten Fall erhielt man keine lineare Kinetik für die Zellwand.

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß 400 µm dicke, frische Schnitte aus der Tagstellung, wenn sie 1 h lang in 1/10 S_1 (20 mOsm) inkubiert waren, um 38 - 54 % (n = 4) länger wurden (bezogen auf die Länge der Schnitte in Luft unmittelbar nach dem Schneiden, die 100 % gesetzt wurde). Flexorschnitte wurden um 34 - 45 % (n = 3) länger. Alle Schnitte wurden nur um ca. 6 % breiter. Die Korrelation zwischen Länge und Volumen kann daher proportional angenommen werden.

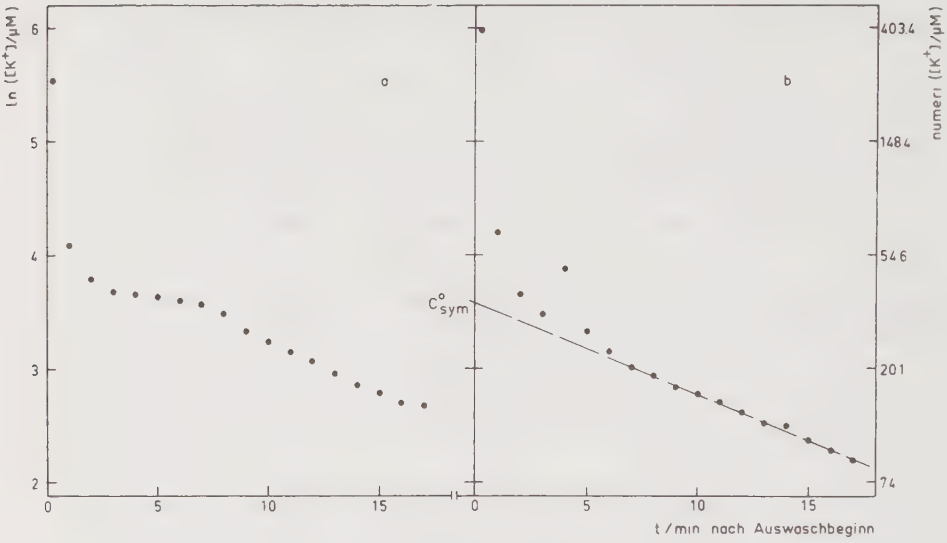

Abb. 5 Zwei Beispiele von K^+-Auswaschexperimenten mit hypotonischer Auswaschlösung.

a. 2 x 2 frische Extensortangentialschnitte aus Blattgelenken in der Nachtstellung werden nacheinander mit 5 mM RbCl, 5 mM NaCl ausgewaschen. Damit sich die Schnitte beim Auswaschen nicht krümmen konnten, waren sie zwischen Nylonnetzchen eingeklemmt. Die K^+-Konzentration der gesammelten Proben (1 x 30 sec, 17 x 1 min-Intervalle) ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Diese Gesamtkinetik aus Zellwand- und Symplastenkomponente ist wegen des Plateaus nicht aufzusplitten.

b. Experiment wie in a. Wegen des Sprungs bei t = 4 min ergibt sich keine lineare Zellwandkinetik nach der Differenzbildung.

Bestimmung der isotonischen Auswaschlösung:

Weil die Kinetik der K^+-Auswaschexperimente in hypotonischer Lösung oft entgegen aller Erwartung Störungen zeigte, (Abb. 5 a und b), wurde empirisch die Konzentration des Auswaschmediums ermittelt, bei der die frisch gefertigten Schnitte sich weder ausdehnten noch schrumpften. Dafür wurden Extensortangentialschnitte aus der Tag- bzw. Nachtstellung in unterschiedlich konzentrierte LiCl, NaCl-Lösungen gelegt (ausgewähltes Auswaschmedium). Das Ergebnis, nämlich die zeitliche Längenänderung der Schnitte in Abhängigkeit von der Osmolarität, ist in Abb. 6 gezeigt. Man sieht, daß sich Schnitte aus der Tagstellung bei 100 mM bzw. 150 mM LiCl, 50 mM NaCl ausdehnen; erst bei 250 mM Gesamtkonzentration scheint die Länge um den Ausgangswert zu schwingen. Schnitte aus der Nachtstellung behalten erst bei 250 mM oder 300 mM LiCl/NaCl ihr(e) Länge/Volumen konstant.

Diese stichprobenhaften Ergebnisse sind durch systematische Untersuchungen bestätigt (SCHAFHAUSER 1982). Danach behalten Extensortangentialschnitte aus der Tagstellung in ca. 400 mM Mannitlösung ihre Länge bei; Extensorschnitte aus der Nachtstellung bleiben bei ca. 470 mM Mannitlösung bei der ursprünglichen Länge.

Die in 3.4.2.1. genannten, verwendeten Auswaschkonzentrationen für frisch angefertigte Schnitte (200 mM LiCl, 50mM NaCl für Tagstellung bzw. 150 mM LiCl, 50mM NaCl für Schnitte aus der Nachtstellung) waren also im nachhinein betrachtet für Tag und Nacht verkehrt herum gewählt. Da die Auswaschkinetiken jedoch gut in die zwei Komponenten aufzutrennen waren, scheint das experimentelle Verfahren einschließlich der verwendeten Konzentrationen angemessen gewesen zu sein.

Organische Osmotika wie Mannit wären als Bestandteil der Auswaschlösung geeignet gewesen, das Volumen der Schnitte konstant zu erhalten. Auf keinen Fall sind sie aber geeignet für die photometrische K^+-Bestimmung am AAS-Gerät; denn sie verkrusten die Brennerscheide in kurzer Zeit total.

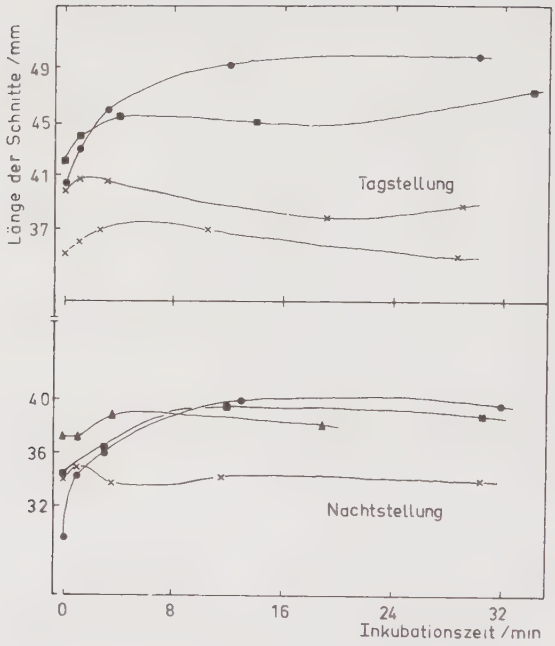

Abb. 6 Längenänderung einzelner frischer Extensortangentialschnitte (300 µm dick) aus Tagstellung bzw. Nachtstellung in LiCl, NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration: —●— 100 mM LiCl, 50 mM NaCl; —■— 150 mM LiCl, 50 mM NaCl, —×— 200 mM LiCl, 50 mM NaCl; —▲— 250 mM LiCl, 50 mM NaCl. Bei t = 0 min werden die Schnitte angefertigt und wird ihre Länge an Luft bestimmt. Dann werden die Schnitte auf einem Objektträger in den angegebenen Lösungen inkubiert. Die Längenänderung wird beobachtet unter einem Binokular mit Zeichenspiegelaufsatz (M 4 Wild Heerbrugg) bei 12,5facher Vergrößerung.

3.5. Zellwandvolumenbestimmung mit ^{14}C-Inulin

Die Kenntnis des Zellwandvolumens ist wichtig, um die in der Extensorzellwand enthaltenen, austauschbaren Mengen an Kationen in Konzentrationen umrechnen zu können. Die übliche Methode für die Volumenbestimmung ist, zwar in die Zellwand, aber nicht über die Zellmembranen diffundierende Zuckermoleküle zu verwenden (ZIMMERMANN, PILWAT 1971; ROTTENBERG et al. 1972). Für die Versuche wurde ^{14}C-Inulin ausgewählt (ein hochpolymerer Zucker = Polyfructosan). Aus der Menge an aufgenommener Radioaktivität ist das Zellwandvolumen direkt bestimmbar, allerdings nur, wenn das Gelenkgewebe voll durchmarkiert ist.

^{14}C-Inulin-Carbonsäure (Amersham Buchler) war in 1/10 S_1 gelöst (Inulinkonzentration 35 µm bzw. 47 µm) und wurde über den Transpirationsstrom auch von den Blattgelenken aufgenommen (Vorbereitung und Inkubation wie in 3.4.1.1. beschrieben). Nach etwa einem Tag wurde die Inkubation abgebrochen. Aus jedem Gelenk wurde je ein Extensor- und ein Flexorlängsschnitt angefertigt und sofort deren Frischgewicht bzw. tags darauf deren Trockengewicht bestimmt. Für die Szintillationsmessung wurden die Schnitte auf zweierlei Weisen aufgearbeitet. Eine war die Verbrennung der Schnitte in einem Oxymat 4101 (Firma Intertechnique). Das Gewebe verbrannte im Sauerstoffstrom zu $^{14}CO_2$, das beim Durchströmen durch eine Szintillatorlösung vom darin enthaltenen β-Phenylethylamin absorbiert wurde. Oder die Schnitte wurden in einem Mörser zerrieben, ca. drei Tage lang in 1/10 S_1 extrahiert und dann mit Szintillator versetzt und gemessen. Die Ausbeute bei der Verbrennungsmethode war 79 %, die Meßausbeute bei der zweiten Methode in wäßriger Phase betrug 84 % (Bestimmung über Vergleichsproben bekannter Aktivität).

4. Ergebnisse

4.1. Membranpotentialmessungen an Querschnitten aus dem Blattgelenk

4.1.1. Membranpotentialmessungen an frischen Schnitten aus Blattgelenken in verschiedenen Phasen der circadianen Blattbewegung

Die folgenden Potentialmessungen wurden als erster experimenteller Teil dieser Arbeit durchgeführt. Es war noch nichts bekannt über Zellwandeigenschaften und Wasserpotential der Extensorzellen, und es waren erst Anfänge gemacht, was geeignete Meßbedingungen betrifft (GRADMANN, MAYER 1977). So wurde das gleiche Meßmedium S_1 übernommen: 10 mM KCl, 90 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$. Diese hohe Ionenkonzentration war gewählt worden, um Zellwandpotentiale und die Spitzenpotentiale der Elektroden gering zu halten, und außerdem, um unerwünschte Störeffekte durch "Verarmungsschichten" möglichst auszuschließen. Die Konzentration von 203 mOsm lag, wie inzwischen durch Wasserpotentialmessungen mit Mannitol nachgewiesen ist (SCHAFHAUSER 1982), noch unter dem osmotischen Wert des Gewebes in situ. Die S_1-Lösung wurde, nachdem sich ein stabiles Potential nach dem Einstich eingestellt hatte, immer ausgetauscht gegen die S_2-Lösung, die isoosmotisch war, aber eine 10fach geringere K^+-Konzentration enthielt (1 mM KCl, 99 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$). Die dadurch induzierte Hyperpolarisierung des Membranpotentials und anschließende Repolarisierung beim Wiederaustauschen $S_2 \rightarrow S_1$ war ein strenges Kriterium dafür, daß tatsächlich ein Membranpotential abgeleitet wurde (Abb. 7). Denn man weiß, daß das Diffusionspotential auch bei höheren Pflanzen in der Hauptsache durch K^+ bestimmt ist und daher im Betrag stark von der K^+-Konzentration der umgebenden Badelösung abhängt. Dieser $S_1 \rightarrow S_2$ Austausch ändert das Zellwandpotential nicht, auch wenn für kurze Zeit noch mehr Na^+ statt K^+ die fixierten Anionen der Zellwand absättigt (GRADMANN, MAYER 1977).

Alle elektrischen Messungen wurden innerhalb von 1,5 h nach dem Schneiden an einem oder mehreren aus einem Gelenk gefertigten Schnitten durchgeführt; denn in Parallelversuchen war festgestellt worden, daß das Membranpotential umso negativer wird, je länger die Schnitte in S_1 liegen (siehe 4.1.2.). Eine Inkubationszeit von 1,5 h dagegen ändert das Ruhepotential noch nicht auffällig.

Die Bewegungsphase, in der die Schnitte angefertigt wurden, wurde auf Stunden genau ausgewertet (Anzahl der Stunden zwischen einem aufgezeichneten Senkungsmaximum und dem Schnittzeitpunkt, dazuaddiert noch die Zeit zwischen Schneiden und Messen ($\leq$ 1,5 h)). Die einzelnen Bewegungsphasen wurden dann in Gruppen von jeweils fünf Stunden zusammengefaßt: 0 - 4,9 h, 5 - 9,9 h, 10 - 14,9 h, 15 - 19,9 h, 20 – 24,9 h, 25 - 28 h, wobei ungefähr 0 - 10 h der Hebungsphase entspricht, 10 - 20 h der Tagphase und 20 - 28 h der Senkungsphase. Bei Schnitten, die bezüglich ihrer Phase in die letzten beiden Gruppen kamen, wurde außer der Bewegungsphase in Stunden auch die tatsächliche Blattposition überprüft, da aufgrund einer unterschiedlichen Schwingungsdauer die Blattstellung nicht zuverlässig mit der Zeit korreliert ist. Es wurde Folgendes überlegt und durchgeführt: In die Gruppe 20 - 24,9 h kamen Schnitte aus Gelenken, die sich zu Beginn der Senkungsbewegung befanden, in die Gruppe 25 - 28 h solche, bei denen das Blatt schon stark gesenkt oder in Nachtstellung war.

4.1.1.1. Membranpotential der Extensorzellen in S_1 in Abhängigkeit von der Bewegungsphase der Blätter

Nur durch den Austausch der Lösungen S_1 -> S_2 -> S_1 als Membranpotential identifizierte Spannungsmessungen (Abb. 7) gehen in die Mittelwertsberechnung ein. Die abgeleiteten Potentiale sind mit großer Wahrscheinlichkeit nicht allein Plasmalemmapotentiale, sondern sind über Plasmalemma und Tonoplast in Serie gemessen, weil die Cytoplasmaschicht um die Vakuole herum so dünn ist, daß die Elektrode beim Einstich vermutlich bis in die Vakuole dringt.

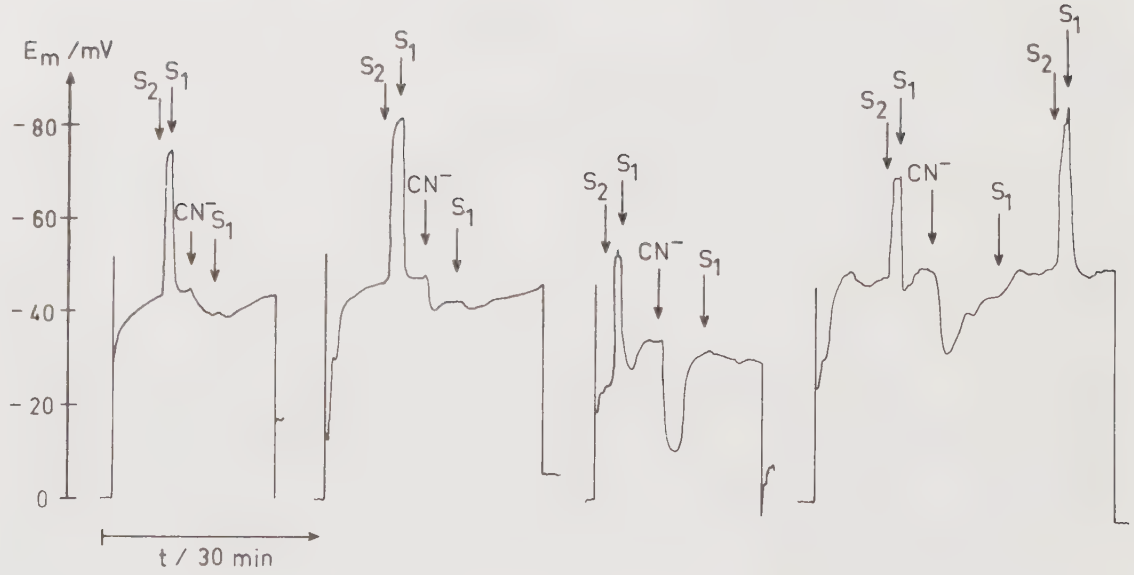

Abb. 7 Beispiele von Membranpotentialmessungen an Extensorzellen in frischen Schnitten. Wechsel der Badelösung S_1 -> S_2 (10 mM KCl, 90 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$ -> 1 mM KCl, 99 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$) induziert eine Hyperpolarisierung, S_2 -> S_1 eine entsprechende Repolarisierung; 1 mM CN^- löst reversible Depolarisationen aus; der Potentialsprung beim Einstich (S_1) entspricht dem Zellwandpotential.

In Abb. 8 a ist das Membranpotential in S_1 in Abhängigkeit von der Bewegungsphase dargestellt, in der die Schnitte aus den Gelenken angefertigt wurden. Man sieht, daß das mittlere Ruhepotential circadian schwankt und zwar während der Nachtstellung der Blätter negativer ist als während der Tagstellung. Den negativsten Mittelwert von -44,3 mV $\pm$ 3,9 ergeben Ableitungen an Extensorzellen aus der Phasengruppe 25 - 28 h (Blätter stark gesenkt). Der Mittelwert des Ruhepotentials der späten Tagphase (15 - 19,9 h) ist -35,6 mV $\pm$ 2,5. Beide Werte sind statistisch voneinander verschieden (t-Test $p < 0,1$). Ebenso sind es die beiden Werte der zweiten (5 - 9,9 h) und vierten Gruppe (15 - 19,9 h) mit $p < 0,02$. In Abb. 8 b ist die prozentuale Verteilung der durchgeführten Versuche innerhalb der eingehaltenen 1,5 h Meßzeit für die sechs verschiedenen Phasengruppen dargestellt. In fünf Gruppen ist die Verteilung so, daß mehr als 55 % der Experimente während der ersten 36 Minuten nach dem Schneiden ($\leq 0,6$ h) durchgeführt wurden. Nur die Versuche der Phasengruppe 15 - 19,9 h sind anders verteilt. Hier wurden nur 46 % der Experimente in den ersten 36 Minuten nach dem Schneiden beendet. Damit ist also gesichert, daß die gewonnenen elektrischen Daten zumindest, was das Altern der verletzten Schnitte betrifft, miteinander in Beziehung gesetzt werden können, weil die Verteilung der Meßzeitpunkte während der 1,5 h annähernd gleich ist (mit nur einer Ausnahme).

Die Streuung der abgeleiteten Potentiale ist bei jeder Phasengruppe sehr groß; die Membranpotentiale liegen insgesamt zwischen -20 mV und -67 mV.

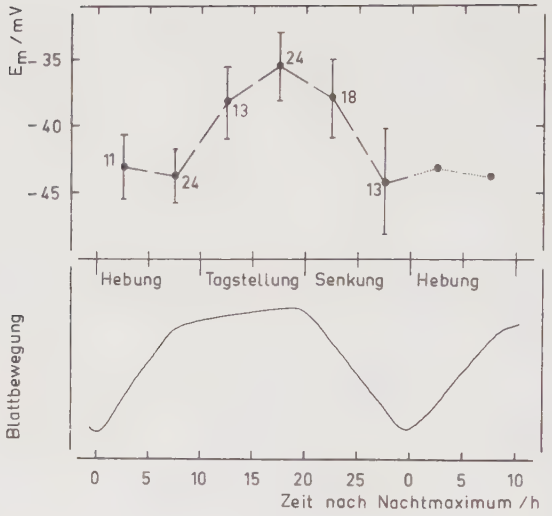

Abb. 8 a Mittleres Membranruhepotential $E_m \pm SF$ von Extensorzellen in frischen Schnitten in der Badelösung S_1 in Abhängigkeit von der Bewegungsphase der Blätter; Zahlen an der Kurve geben die Anzahl der durchgeführten Messungen an verschiedenen Schnitten an; darunter der circadiane Verlauf der Blattbewegung

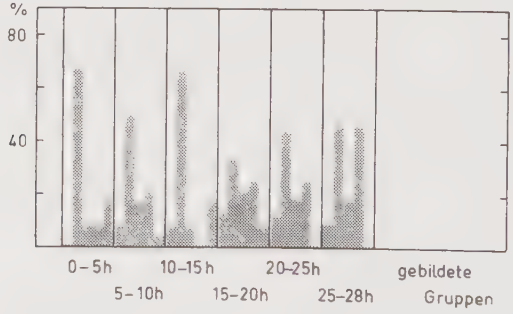

Abb. 8 b Prozentuale Verteilung der durchgeführten Messungen in den einzelnen Phasengruppen innerhalb der 1,5 h Meßzeit, die definitionsgemäß eingehalten wurde (jeweils 5 x 0,3 h-Intervalle)

4.1.1.2. Durch CN^- ausgelöste Depolarisierung des Ruhepotentials in Abhängigkeit von der Bewegungsphase der Blätter

Mit dem Inhibitor 1 mM NaCN in S_1 wurde getestet, ob das Ruhepotential durch aktive, elektrogene Ionentransportprozesse negativer gemacht ist. Durch 1 mM CN^- wird in den Mitochondrien die Bereitstellung/Produktion von ATP für eine elektrogene Pumpe am Plasmalemma (und am Tonoplasten) gehemmt. Tatsächlich wurde das Membranpotential der Extensorzellen in der Regel durch CN^- depolarisiert. Beispiele finden sich in Abb. 7. Man sieht, daß die Depolarisierung sehr unterschiedlich verlaufen kann: die Spannung wird auf einen stabilen Wert depolarisiert und anschließend im normalen Bademedium wieder repolarisiert (Beispiel 1; die CN^--Lösung wurde nur möglichst kurze Zeit angeboten, da die Schnitte oft unter CN^--Einwirkung schrumpfen; siehe unten) oder das Membranpotential wird depolarisiert und teilweise schon wieder repolarisiert auf einen konstanten Wert (Beispiele 2 und 3); im vierten Beispiel verläuft die Repolarisation sogar mit Oszillationen (vergl. Abb. 14 und Abb. 17).

Jeweils die maximale Depolarisation durch CN^- wurde ausgewertet. Und das Ergebnis ist, daß im Mittel der Betrag der Depolarisation je nach Bewegungsphase unterschiedlich ist (Abb. 9). Die größte Depolarisation zeigen die Extensorzellen der Schnitte, die aus der Nachtstellung (25 - 28 h) kamen, nämlich im Mittel 13,5 mV $\pm$ 3,8. Das Ruhepotential von Extensorzellen der Tagphase (10 - 20 h) wird dagegen im Durchschnitt nur um 4,9 mV $\pm$ 2,3 bzw. 5,5 mV $\pm$ 1,6 depolarisiert. Die größte gemessene Depolarisierung bei einem Versuch betrug 30 mV bei einem Ruhepotential von -64 mV (Bewegungsphase 27,1 h). Die Mittelwerte der Phasengruppen 0 - 4.9 h und 15 - 19,9 h sind mit $p < 0,1$ signifikant voneinander verschieden; genauso sind es die Werte der Phasengruppen 15 - 19,9 h und 25 - 28 h mit $p < 0,05$ (t-Test). Das im Mittel negativere Ruhepotential nachts ist also korreliert mit größerer Depolarisierbarkeit durch CN^-.

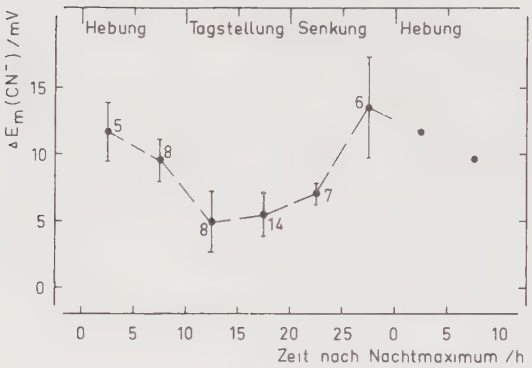

Abb. 9 Circadianer Verlauf der maximal erreichten Membrandepolarisierung in Extensorzellen von frischen Schnitten nach Zugabe von 1 mM CN^- zu S_1; Mittelwerte ± SF, daneben als Zahl die Menge der durchgeführten Messungen.

Bei 15 von 51 Experimenten (29 %) traten im Verlauf des Experiments auch sprungartige Potentialänderungen auf, z. B. während das CN^--Bademedium angeboten wurde (Abb. 10). Steckte die Elektrode plötzlich in einem anderen Kompartiment, im Cytoplasma oder in der Zellwand? In ca. 2/3 dieser Fälle schlüpfte etwas später die Elektrode völlig aus der Zelle heraus (das Potential fiel auf das Spitzenpotential zurück), vermutlich weil der Schnitt unter CN^--Einwirkung schrumpfte. Dieser Vorgang wurde sowohl an Schnitten aus der Tagphase wie an solchen aus der Nachtphase beobachtet.

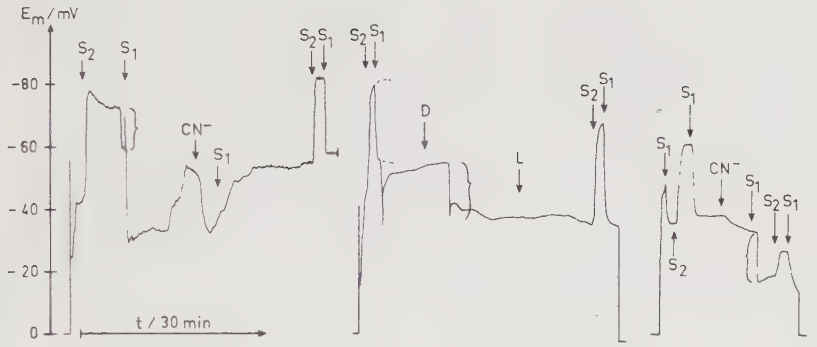

Abb. 10 Beispiele für spontane Membranpotentialsprünge
erstes Beispiel (links): noch während S_2 angeboten wird, fällt das Potential plötzlich um ca. 13 mV (siehe }); die Depolarisation infolge von S_2 -> S_1 ist entsprechend verschoben; es ist nicht klar, ob die Elektrode in S_1 (vor CN^-) wieder ins ursprüngliche Kompartiment zurückwechselt.
zweites Beispiel (Mitte): nach S_2 -> S_1 fällt das Potential vorübergehend ab; nach Licht-aus (D) passiert der gleiche Potentialsprung um ca. 18 mV nochmals; da die folgende S_1 -> S_2 -> S_1 -Reaktion nach wie vor groß ist, wechselt die Elektrode vermutlich nur zwischen den zellulären Kompartimenten Cytoplasma und Vakuole.
drittes Beispiel (rechts): noch bevor die Repolarisation in S_1 nach der Cyanidapplikation einsetzt, fällt das Membranpotential plötzlich um 16 mV; die darauffolgende S_1 -> S_2 -> S_1-Reaktion ist deutlich kleiner.

4.1.1.3. Änderung des Ruhepotentials durch Veränderung der K^+-Konzentration in der Badelösung in Abhängigkeit von der Bewegungsphase der Blätter

Es wurde bereits in 4.1.1. erwähnt, daß nach jedem gelungenen Anstich vorübergehend die K^+-Konzentration der Badelösung um das Zehnfache reduziert wurde ($S_1 \rightarrow S_2$). Die Mittelwerte der ausgelösten Hyperpolarisierungen (und der entsprechend großen Repolarisierungen beim Übergang $S_2 \rightarrow S_1$) sind in Abb. 11 gegen die Bewegungsphase der Blätter aufgetragen und zwar für zwei verschiedene, ausgewählte Spannungsbereiche, in die die meisten gemessenen Membranpotentiale sich verteilten. Auch hier ändert sich der Betrag der Spannungsänderung ΔE_m ($S_1 \rightarrow S_2$) rhythmisch im Tagesgang der Bewegung. Langsam von der Hebungsbewegung hin zur frühen Tagstellung wird der Wert um ca. 7 mV größer (von 19 mV steigt er auf 25 mV bzw. von 22 mV auf 30 mV für die Spannungsbereiche -30 bis -40 mV bzw. -40 mV bis -50 mV; siehe unten). Danach während der späten Tagphase wird der Betrag in beiden Kurven vorübergehend wieder kleiner. Wie groß er während der Senkungsbewegung ist, ist nicht klar, weil die Kurven während der Bewegungsphase 20 - 24,9 h nicht parallel laufen. Ein noch erhöhter Betrag der induzierten Spannungsänderung für die Zeit, wenn die Blätter vollends in Nachtstellung gehen (25 - 28 h), ist jedoch auffällig und in beiden Kurven vorhanden.

Als Hauptergebnis dieser Versuche kann vermutlich auch auf eine circadiane Änderung des Betrages der Membranhyperpolarisierung geschlossen werden: kleine Beträge von ΔE_m ($S_1 \rightarrow S_2$) während der Nachtphase und größere ΔE_m ($S_1 \rightarrow S_2$) während der Tagstellung. Und insoweit stimmen die drei verschiedenen Ergebnisse der elektrischen Messungen auch überein: Während der Tagphase, wenn das Membranpotential im Mittel niedrig ist, ist die CN^--Depolarisierung und damit der elektrogene Anteil am Potential gering, aber die passiven, diffusen Eigenschaften der Membran, sichtbar in den induzierten Spannungsänderungen durch die veränderte K^+-Außenkonzentration, spielen eine große Rolle. Demgegenüber fallen während der Nachtstel-

lung, wenn das Ruhepotential der Extensorzellen negativer und gleichzeitig die CN^--Depolarisierung größer ist, die Spannungsänderungen durch $S_1 \rightarrow S_2$ klein aus. Die Einkerbung während der Bewegungsphasen 15 - 19,9 h und 20 - 24,9 h kann aber nicht mehr übersehen werden. Sie ist durch mehr Messungen im Vergleich mit veröffentlichten Daten (FREUDLING et al. 1980) deutlich hervorgetreten. Jedoch sind die Unterschiede nicht signifikant (MWU-Test): $p = 0{,}14$, wenn die Experimente der Gruppen 15 - 19,9 h und 20 - 24,9 h verglichen werden (Membranspannungen zwischen -40 mV und -50 mV); $p = 0{,}33$ beim Vergleich der Gruppen 20 - 24,9 h und 25 - 28 h (E_m zwischen -30 mV und -40 mV).

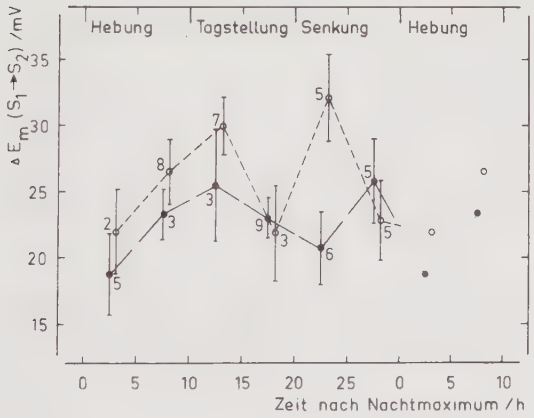

Abb. 11 Mittelwerte $\pm$ SF der Membranhyperpolarisierung von Extensorzellen in frischen Schnitten, wenn die K^+-Konzentration des Bademediums um das 10fache reduziert wird ($S_1 \rightarrow S_2$), für zwei ausgewählte Spannungsbereiche von E_m (——— -30 mV bis -40 mV, – – – -40 mV bis -50 mV) in Abhängigkeit von der Bewegungsphase der Blätter; die Zahlen an den Kurven geben die Menge der durchgeführten Messungen an.

Die engen Spannungsbereiche für Abb. 11 wurden ausgewählt, weil die gemessenen Ruhepotentiale, wie erwähnt, sehr streuten und weil beim Auswerten beobachtet worden war, daß ΔE_m ($S_1 \rightarrow S_2$) unabhängig von der Bewegungsphase im Mittel umso größer ausfiel, je größer das Ruhepotential in S_1 war. Das kann mit der Selektivität von Membranen erklärt werden: Je größer die Selektivität des Plasmalemmas für Ionen ist (genauer: je besser K^+ permeieren kann, verglichen mit anderen Ionen, z. B. Cl^-), desto höher ist der Betrag des Membranpotentials und desto größer ist dann auch ΔE_m ($S_1 \rightarrow S_2$). Möglicherweise hängen die großen Unterschiede in der Selektivität bei den einzelnen Experimenten mit der Störung/Änderung der Membranleitfähigkeit durch das Schneiden, mit der Variation von Pflanze zu Pflanze und mit der Güte des Elektrodenanstichs zusammen.

4.1.1.4. Potentialänderungen bei frischen Schnitten durch Licht-aus/Licht-an Reize

Noch bevor das Ruhepotential von frischen Schnitten durch CN^- auf eine elektrogene Komponente hin untersucht wurde, war getestet worden, ob Licht-aus/Licht-an Reize das Membranpotential verändern. In Abb. 12 sind drei Beispiele dargestellt: bei Licht-aus eine starke Hyperpolarisierung bzw. eine Depolarisierung bzw. nur eine kleine Reaktion; bei Licht-an wird einmal eine Depolarisation, das andere Mal eine Oszillation oder beim dritten Beispiel keine Reaktion ausgelöst. Bei insgesamt 23 Versuchen in verschiedenen Bewegungsphasen wurden jedoch entweder nur geringe Depolarisierungs- und Hyperpolarisierungsreaktionen (≤ 6 mV) gemessen oder überhaupt keine Reaktionen beobachtet. Bei sechs Versuchen schlüpfte auch wieder während des Dunkel/Licht-Programms die Elektrode heraus. Diese Untersuchungen wurden wegen der kritischen Reproduzierbarkeit nicht weitergeführt.

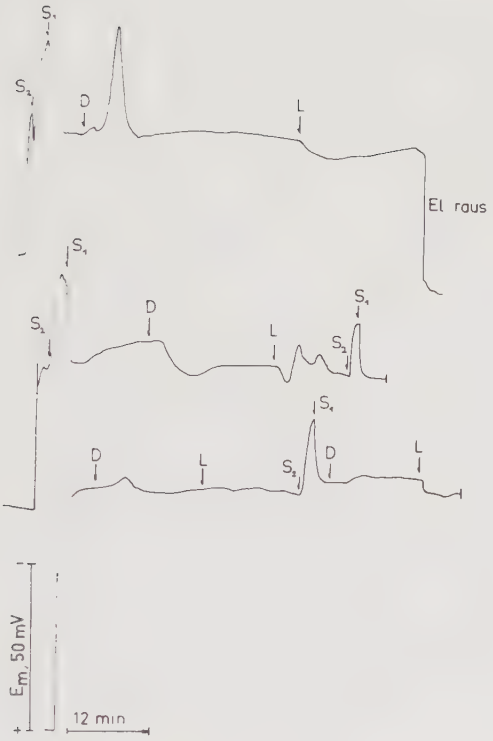

Abb. 12 Beispiele der Wirkung von Licht-aus/Licht-an Reizen auf das Membranpotential von Extensorzellen frischer Querschnitte (D bedeutet Licht-aus, L ist Licht-an)

4.1.1.5. Extensorzellwandpotential bei frischen Schnitten in Abhängigkeit von der Bewegungsphase der Blätter

In Abb. 7 sieht man, daß bei jeder Membranpotentialregistrierung zu Beginn ein großer Potentialsprung auftrat. Er rührt nach mikroskopischer Beobachtung und elektrophysiologischer Meßerfahrung daher, daß die Meßelektrode den Schnitt, d. h. ein Stückchen zu äußerst liegende Zellwand kurzzeitig berührte und das Zellwandpotential registrierte. Dann aber

wurde die Elektrode durch die Zellwand hindurch in die Zelle eingeführt. Diese Zellwandpotentialaufzeichnungen bei Potentialmessungen an Extensorzellen frischer Schnitte im Bademedium S_1 wurden auch systematisch ausgewertet. Die berechneten Mittelwerte sind in Abhängigkeit von der Bewegungsphase der Blätter gemeinsam mit den Mittelwerten der registrierten Membranpotentiale (aus Abb. 8 a) in Abb. 13 gezeichnet. Man sieht, daß auch die mittlere Größe der Zellwandpotentiale circadian schwingt. Die Potentiale sind negativer, wenn die Schnitte aus Gelenken von abgesenkten Blättern stammten. Sie sind um maximal 12,5 mV positiver, wenn die Schnitte aus Blattgelenken von Blättern in Tagstellung angefertigt wurden. Die Zellwandpotentiale und Membranpotentiale schwingen gleichsinnig, wobei die Durchschnittswerte der Wandpotentiale meistens sogar etwas negativer sind als die Mittelwerte der Membranpotentiale (vergl. GRADMANN, MAYER 1977). Wenn die Blätter abgesenkt wurden bzw. waren, ist der Unterschied zwischen Zellwandpotential und Membranpotential größer als während der Tagphase der Bewegung.

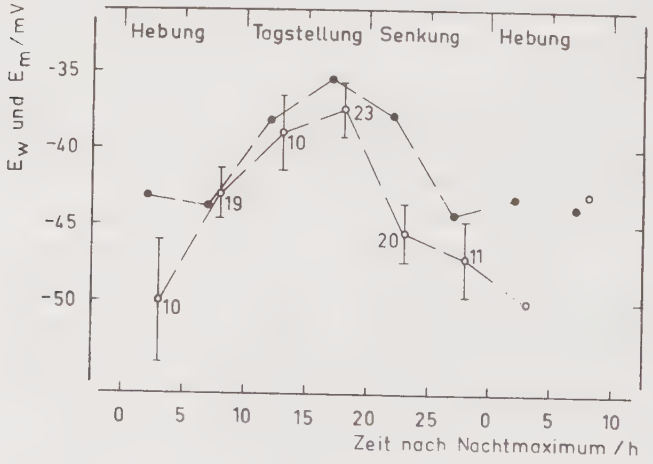

Abb. 13 Mittelwerte ($\pm$ SF) des Zellwandpotentials E_W (—○—) und des Membranpotentials E_m (—●—) von Extensorzellen frischer Schnitte im Bademedium S_1 in Abhängigkeit von der Bewegungsphase der Blätter; Zahlen bei den Mittelwerten der Zellwandpotentiale geben die Anzahl der Auswertungen an.

4.1.2. Membranpotentialmessungen an 24 h lang "gealterten" Schnitten

Es zeigte sich, daß Extensorzellen in Querschnitten, die einen Tag lang in S_1 im Dauerlicht in der Klimakammer inkubiert gelegen waren, ein viel negativeres Membranpotential hatten als Extensorzellen in frisch angefertigten Schnitten. Im Mittel betrug es -133 mV $\pm$ 4 (n = 20; Tab. 2, Tab. 4). Diese hohen Potentiale reagierten nur noch mit kleinen Spannungsänderungen zwischen 6 und 14 mV (im Mittel 9,4 mV $\pm$ 0,64; n = 15) auf die Änderung der K^+-Konzentration im Meßmedium ($S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_1$). Jedoch reagierten die Zellen mit einer starken, reversiblen Depolarisierung auf Inhibitoren wie 1 mM NaCN in S_1 oder 1 mM NaCN + 1 mM Salicylhydroxaminsäure (SHAM) in S_1 oder 1 mM NaN_3 in S_1 (Abb. 14, Abb. 15 und Tab. 2). Im Mittel betrug die Depolarisation 92 mV $\pm$ 4,9 (n = 10). Die Repolarisation scheint via Oszillationen abzulaufen. Die Membranpotentiale wurden durch die Inhibitoren vorübergehend auf Diffusionspotentiale zwischen -28 mV und -52 mV depolarisiert, die in der gleichen Größenordnung lagen wie die Potentiale bei frischen Schnitten (siehe Abb. 8). Allerdings muß beim Vergleich der Diffusionspotentiale berücksichtigt werden, daß sich durch das Altern in S_1 vermutlich die Ionenzusammensetzung im Cytoplasma und in der Vakuole ändert (siehe 5.2.1.3.). Das Na^+:K^+-Verhältnis wird 9 : 1 wie im Bademedium S_1, obwohl in situ und bei frischen Schnitten K^+ in den Zellkompartimenten weit überwiegt.

Einmal wurde an einem alternden Schnitt zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils eine neue Extensorzelle angestochen zur Potentialmessung. Der auf diese Weise indirekt verfolgte Potentialanstieg infolge von Alterungsprozessen ist in Tab. 3 dargestellt. In diesem Versuch scheint nach 7 h Inkubation die elektrogene Komponente am Potential schon nahezu maximal geworden zu sein.

gealterte Schnitte	E_m in S_1 (mV)	Depolarisation auf 1 mM N_3^- (mV)	Depolarisation auf 1 mM CN^- + 1 mM SHAM (mV)	E_m unter Inhibitoreinwirkung (mV)	ΔE_m bei pH-Änderungen der gepufferten S_1-Lösung (mV)
1	- 146		105	- 41	
2	- 137		94	- 43	
3	- 148		100	- 48	
4	- 108	77		- 31	pH 5.9→4.[illegible] + 42 mV
5	- 145	111		- 34	pH 5.9→4.[illegible] + 56 mV 4.1→5.[illegible] - 58 mV
6	- 122	80		- 42	
7	- 106	78		- 28	
8	- 134	96		- 58	
9	- 102	68		- 34	pH 5.9→4.[illegible] + 28 mV 4.8→6.[illegible] - 16 mV
9 2.Einstich	- 84				pH 5.9→6.[illegible] - 20 mV 6.7→5.9 + 30 mV 5.9→4.[illegible] + 26 mV 4.8→6.[illegible] - 50 mV
10	- 164		122	- 52	

Tab. 2 Zusammenstellung von Potentialmessungen in Extensorzellen von gealterten Schnitten (Inkubation in S_1 im Dauerlicht ca. 24 h lang); E_m wird durch Inhibitoren depolarisiert; E_m ist pH-sensitiv: + bedeutet Depolarisierung, - Hyperpolarisierung; Ethanolkontrolle bei Schnitt 3, weil SHAM in Ethanol vorgelöst werden muß; 1 % Ethanol hyperpolarisiert E_m um 14 mV; Schnitt 10 war 48 h lang in S_1 im Dauerlicht gealtert.

Die schon bei frischen Schnitten vorhandene, elektrogene Komponente am Membranpotential ist bei gealterten Schnitten also verstärkt vorhanden. Es lag deswegen nahe, das Ion ausfindig zu machen, das aktiv über das Plasmalemma transportiert wird und dessen Verschiebung das Potential um 68 bis 111 mV negativer macht. Für Flexorzellen in Schnitten aus Bohnenblattgelenken war bereits eine Cl^--Pumpe favorisiert worden (GRADMANN, MAYER 1977). Bei Zellen höherer Pflanzen wird aber im allgemeinen eine Protonenpumpe am Plasmalemma für wahrscheinlich gehalten (RAVEN, SMITH 1980; SPANSWICK 1981).

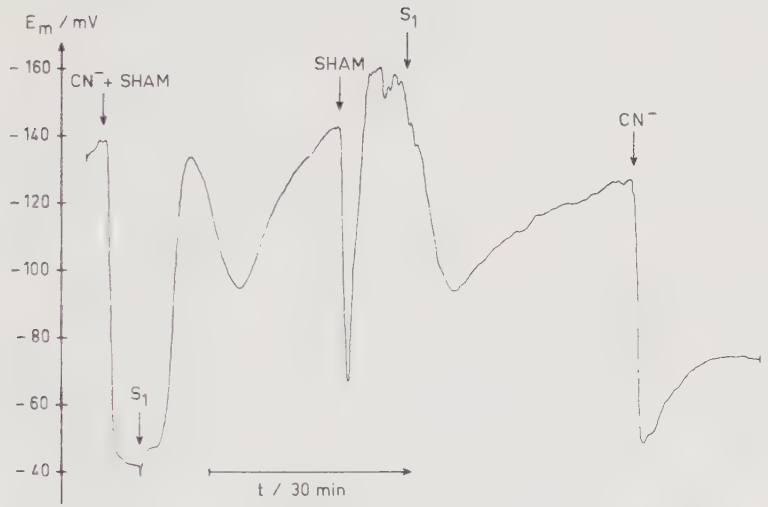

Abb. 14 Verschiedene Inhibitoren (1 mM CN^- + 1 mM SHAM in S_1, 1 mM SHAM in S_1 , 1 mM CN^- in S_1) depolarisieren das Ruhepotential von Extensorzellen in 24 h lang gealterten Schnitten; die Potentialänderungen sind reversibel.

Dauer der Inkubation in S_1 (h)	E_m (mV)	Betrag der Depolarisierung durch CN^- + SHAM (mV)	E_{diff} unter Inhibitoreinwirkung (mV)
1.5	- 44	6.9	- 3[illegible].1
7.0	- 104	76.8	- [illegible].2
10.7	- 124	75.6	- 45.4

Tab. 3 Elektrische Messungen zum zeitlichen Verlauf des Alterns an einem in S_1 und Dauerlicht (Weißlicht) inkubierten Schnitt.

Deswegen wurden einige Versuche durchgeführt, die qualitativ zeigen sollten, ob der elektrogene Potentialanteil bei den gealterten Schnitten von einer Protonenpumpe herrühren könnte. In Tab. 2 sind in einer Spalte die Potentialänderungen aufgeführt, die durch pH-Änderungen in der gepufferten S_1-Lösung erhalten wurden. In Abb. 15 ist ein Potentialverlauf bei pH-Änderungen gezeichnet. Die Änderungen (Hyperpolarisierung oder Depolarisierung) sind so, wie man es nach gängiger Vorstellung eines elektrogenen Protonentransports vom Cytoplasma nach außen erwartet: Eine Erniedrigung des pH-Wertes der Badelösung hemmt die Pumpe durch die erhöhte Protonenkonzentration außen (d. h. in der Zellwand); das Potential wird weniger negativ. Eine Verringerung der Protonenkonzentration außen erleichtert den Transport von Protonen nach außen; die Zelle hyperpolarisiert. Abb. 16 illustriert in anderer Weise die gemessene Abhängigkeit des Membranpotentials vom pH-Wert der gepufferten Badelösung. Die Kurve verläuft sanft gekrümmt mit zunehmender Steigung (mV/pH-Einheit) bei alkalischem pH außen.

Obwohl also eine pH-Abhängigkeit von E_m nachgewiesen und damit eine Protonenpumpe wahrscheinlich geworden war, wurden diese Untersuchungen nicht fortgeführt. Eine experimentelle Voraussetzung zum Nachweis einer Protonenpumpe war bereits richtig gewählt worden, nämlich eine Pufferkonzentration von mindestens 10 mM (BATES et al. 1982). Denn zur S_1-Lösung wurde ein Na_2HPO_4/NaH_2PO_4-Puffer in der Konzentration 19,8 mM hinzugefügt, und mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen wurden die angegebenen pH-Werte eingestellt.

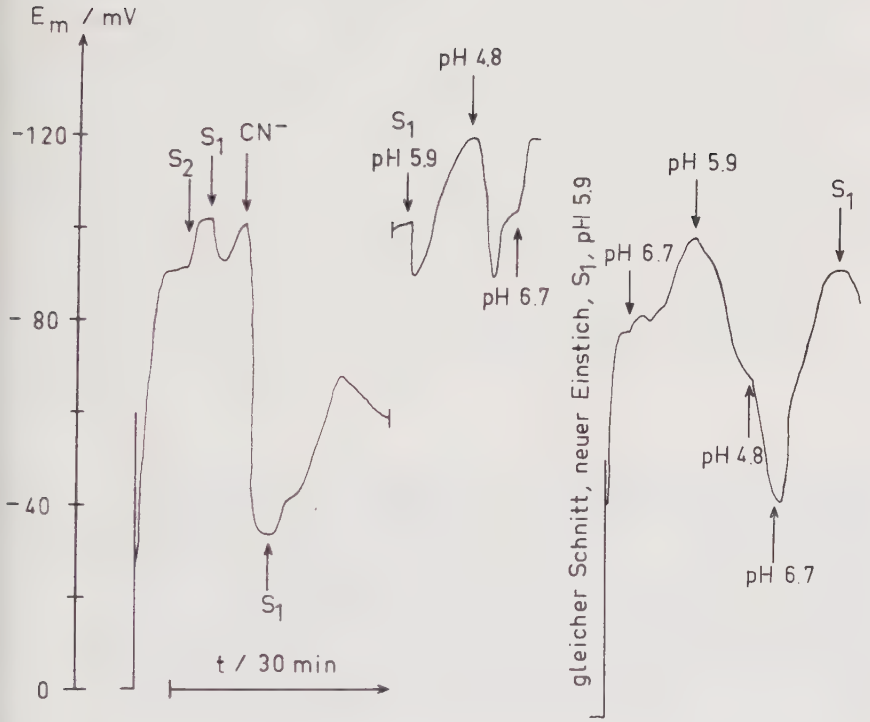

Abb. 15 Änderungen des Membranpotentials bei pH-Änderungen im Bademedium. Der Schnitt lag in S_1 im Dauerlicht ca. 24 h lang inkubiert. Zu S_1 wurde später ein 19,8 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4-Puffer hinzugefügt, mit dem die angegebenen pH-Werte eingestellt wurden. Der Kurvenverlauf wurde auf die angegebene Schreibergeschwindigkeit gestaucht.

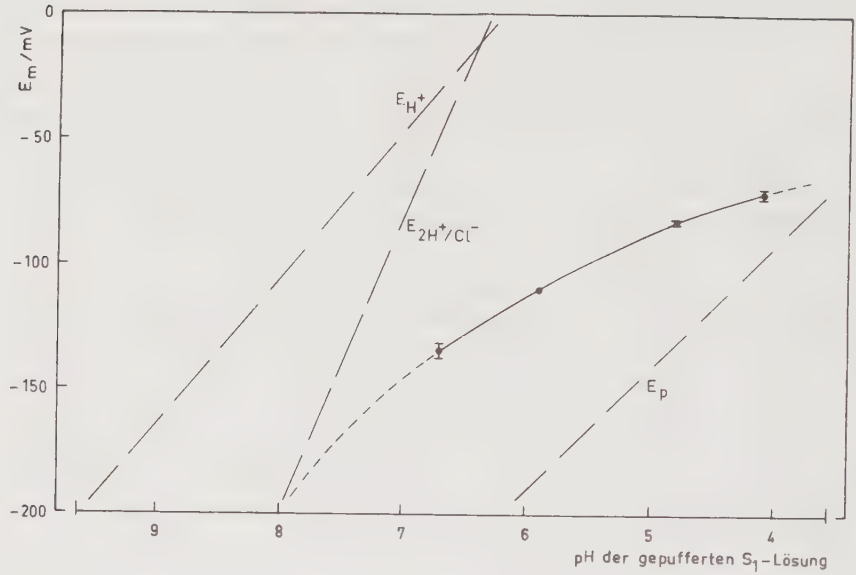

Abb. 16 Effekt des pH-Wertes der gepufferten Badelösung S_1 auf das Membranpotential E_m von Extensorzellen gealterter Schnitte (in Tab. 2 aufgeführte Membranpotentialänderungen bei pH-Änderungen, von pH 5,9 ausgehend, wurden ausgewertet); Bezugspotential ist das mittlere E_m = -110 mV ± 13 in ungepufferter S_1-Lösung (n = 4); gestrichelte Geraden mit einer Steigung von 59 mV/pH-Einheit: Gleichgewichtspotential der elektrogenen Protonenpumpe E_p für eine Stöchiometrie von 2 H^+/ATP bei pH_{innen} = 6,2, Protonengleichgewichtspotential E_{H^+}; gestrichelte Gerade mit einer Steigung 118 mV/pH-Einheit: Gleichgewichtspotential des $2H^+/Cl^-$-Cotransportsystems bei pH_{innen} = 6.2, $[Cl^-]_c$ = 0,15 M, $[Cl^-]_{S_1}$ = 0,10 M.

An diesen gealterten Schnitten mit einem beträchtlichen, elektrogenen Anteil am Membranpotential wurden auch Licht-aus/Licht-an Versuche durchgeführt. In Abb. 17 sind zwei mögliche Reaktionen des Membranpotentials auf Licht-aus bzw. Licht-an gezeichnet. Abb. 17 a zeigt die Spannungsantwort bei den üblichen Versuchsbedingungen; in Tab. 4 sind weitere Versuche zusammengestellt. Der Übergang in Dunkelheit oder Licht bringt das Membranpotential zum Oszillieren. Manchmal fehlt beim Dunkelreiz die allererste schnelle Hyperpolarisierung. Bei sechs von zehn Messungen schlüpfte wieder früher

oder später die Elektrode aus der Zelle, weil vermutlich das Gewebe schrumpfte. Die Kurvenverläufe in Abb. 17 a und b zeigen bei genauer Betrachtung Gemeinsamkeiten: bei Licht-aus scheint erst eine schnelle Hyperpolarisierung abzulaufen (in beiden Kurven gleich vorhanden), überlagert von einer langsameren Schwingung (Depolarisation - Hyperpolarisation - Depolarisation usw.), die unterschiedlich stark ausgeprägt ist, die aber doch in Abb. 17 b bezüglich Richtung gleich angedeutet und bezüglich zeitlichem Verlauf nahezu identisch ist. Bei Licht-an verlaufen die induzierten Schwingungen zeitlich nicht gleich. Insgesamt induziert Dunkelheit hauptsächlich eine vorübergehende Hyperpolarisierung, Licht induziert stärker eine kurzzeitige, starke Depolarisierung. Diese komplexen Spannungsantworten wurden nicht weiter untersucht, da die wichtigste Aufgabe zunächst war, an frischen Schnitten Potentialmessungen im Tagesgang zu machen.

gealterte Schnitte	Phasenlage beim Schneiden (h)	Dauer der Inkubation (h)	E_m in S_1 (mV)	Dunkelreiz	Lichtreiz
1	0.6	25.0	-129	+, El. raus	
2	1.0	25.0	-128	-, +, -, + 21 mV	+, -51 mV, + E_m schwingt über eine Stunde
3	4.9	25.2	-[illegible]	-, +, -37 mV, +48 mV	+, -72 mV, +
4	8.6	25.2	-148	-, +, -, +24 mV, El. raus	
5	10.6	24.5	-147	+, -18 mV, +	+, -53 mV, El. raus
6	14.7	25.6	-124	+, -, +36 mV, -	+, -62 mV
7	26.1	24.6	-138	-, +, -, +49 mV, -, El. raus	
8	26.4	24.2	-138	-, +, -, +26 mV, -	+, -61 mV, El. raus
8	26.4	24.1	-114	-, +, -, +20 mV, -, El. raus	
9	28.8	24.2	-160	+, -20 mV, +, -	+, -45 mV, +

Tab. 4 Zusammenstellung von Potentialmessungen an Extensorzellen von gealterten Schnitten bei Licht-aus/Licht-an Reizen. Verlauf der einzelnen Registrierungen gleich wie in Abb. 17 a; bei Schnitt 8 wurden zwei Zellen parallel abgeleitet; + bedeutet Depolarisation, - Hyperpolarisation von E_m; der Zahlenwert gibt die größte Amplitude bei der ausgelösten Schwingung an.

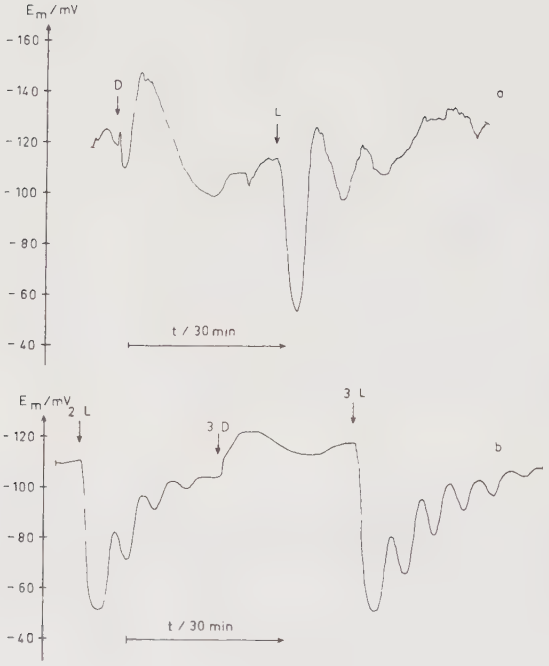

Abb. 17 Zwei Beispiele für den Verlauf des Membranpotentials von gealterten Schnitten, wenn Licht-aus/Licht-an Reize gegeben werden.

a. die Zelle/der Schnitt erhält den ersten Dunkelreiz nach 24 h Alterung in Weißlicht und S_1

b. Schnitt gealtert in S_1 in 15 h Dunkelheit und danach 8 h Licht; 1. Dunkelpuls, 1. Lichtpuls und 2. Dunkelpuls, die ähnliche Spannungsantworten induzierten, sind bereits gegeben.

4.2. Flußexperimente mit Radioisotopen

Die Flußmessungen mit $^{36}Cl^-$ und mit $^{86}Rb^+$ wurden in der beschriebenen Weise (3.4.1.) durchgeführt, um die Anionen- und Kationenverhältnisse in der Zellwand der Motorzellen in situ in unterschiedlichen Bewegungsphasen der Blätter herauszubekommen. Das zu wissen ist wichtig, weil die in der Zellwand vorliegenden Ionenkonzentrationen vom Plasmalemma "gesehen" werden und dessen Membranpotential bestimmen. Die Erwartung war, daß die Flußexperimente an frischen Schnitten interpretierbare Ergebnisse bezüglich der in situ Ionenverhältnisse nur für die Zellwand, aber nicht für die beiden zellulären Kompartimente Cytoplasma und Vakuole ergeben würden; denn die Ionenflüsse allgemein und speziell des beobachteten Isotops über die Membranen würden während des Effluxes - direkt nach dem Schneiden - nicht im Fließgleichgewicht sein. Das jedoch ist Grundvoraussetzung für eine quantitative Effluxanalyse (WALKER, PITMAN 1976).

4.2.1. Efflux von $^{36}Cl^-$

Die $^{36}Cl^-$-Auswaschexperimente an frischen Schnitten ergaben Auswaschkinetiken, die in der Regel in drei Komponenten aufzugliedern waren (Abb. 18 a, 18 b). Alle Auswaschexperimente sind in Tab. 5 zusammengestellt. Die schnellste Komponente 1 tauscht mit Zeitkonstanten zwischen 0,5 und 2,6 min das Cl^- aus (drei Ausnahmen bei n = 25 Experimenten), die mittlere Komponente 2 mit Zeitkonstanten zwischen 9,1 und 28,6 min (vier Ausnahmen bei n = 30), die langsamste Komponente 3 gibt mit Zeitkonstanten zwischen 1,9 und 16,7 h das Cl^- ab (vier Ausnahmen bei n = 30). Bei den 30 an Extensor und Flexor durchgeführten Experimenten fehlte bei fünf Flexorkinetiken die schnellste Komponente 1, d. h. bei 1/3 der Flexorschnitte. Eine für diesen Fall typische Kinetik findet sich in Abb. 19 a und 19 b.

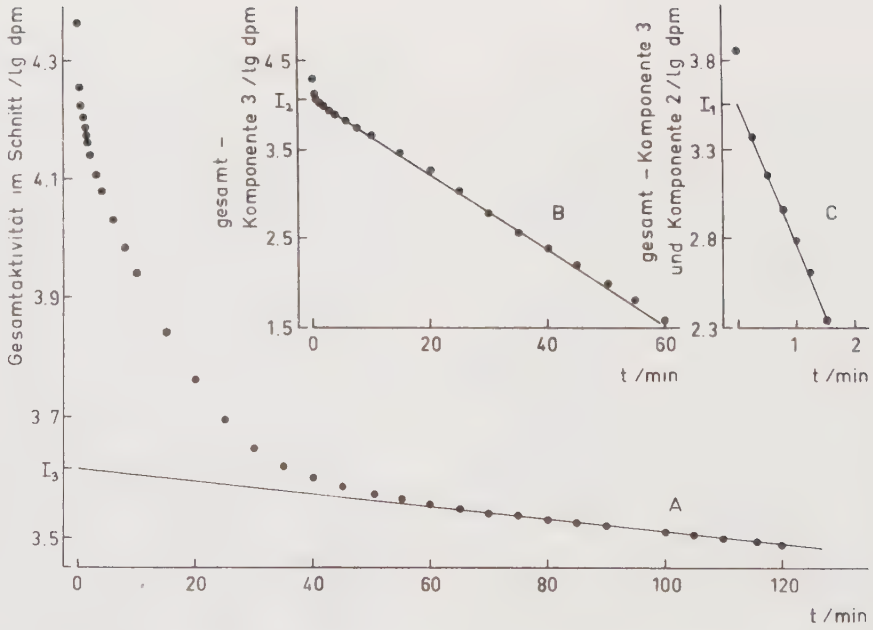

Abb. 18 a $^{36}Cl^-$-Abgabe eines frisch angefertigten Extensortangentialschnittes.

A: gesamter $^{36}Cl^-$-Gehalt im Schnitt (lg dpm) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min). Der lineare Verlauf der Kinetik nach ca. 65 min ergibt die am langsamsten austauschende Komponente 3 (Extrapolation bis t = 0 min ergibt lg I_3, I_3 = 4124 dpm; k_3 = 0,0024 min^{-1} = Steigung der Geraden).

B: Nach Subtraktion der Komponente 3 bleibt noch der $^{36}Cl^-$-Gehalt in Komponente 2 und Komponente 1 (lg dpm) in Abhängigkeit von der Auswaschzeit. Die lineare Kinetik der Komponente 2 wird deutlich. Die Extrapolation bis t = 0 min ergibt lg I_2 (I_2 = 11803 dpm, k_2 = 0,096 min^{-1}).

C: Nach weiterem Subtrahieren bleibt die lineare Kinetik der schnellsten Komponente 1 übrig. Die Extrapolation der Regressionsgeraden ergibt lg I_1 (I_1 = 3686 dpm, k_1 = 1,83 min^{-1}).

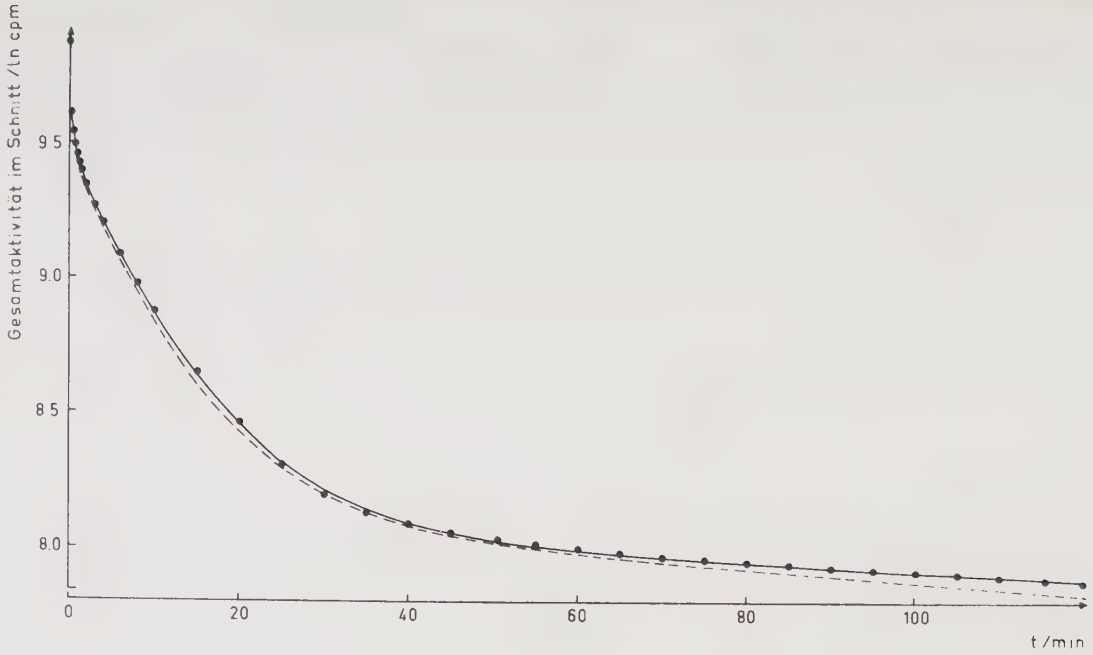

Abb. 18 b Computerplot desselben $^{36}Cl^-$-Effluxexperiments
Die durchgezogene Kurve ist der beste Fit an die eingegebenen Meßpunkte. Programmgemäß werden drei Komponenten optimal berechnet:
I_1 = 2869 cpm, k_1 = 1,42 min^{-1}, I_2 = 9715 cpm, k_2 = 0,090 min^{-1}, I_3 = 3214 cpm, k_3 = 0,0016 min^{-1}. Das Fitprogramm berücksichtigt nicht die Meßpunkte bei t = 0 min und t = 0,25 min. Die aus dem Graph der Abb. 18 a durch Splittung ermittelten und dem Rechner zur Orientierung vorgegebenen I- und k-Werte ergeben die gestrichelte Kurve.

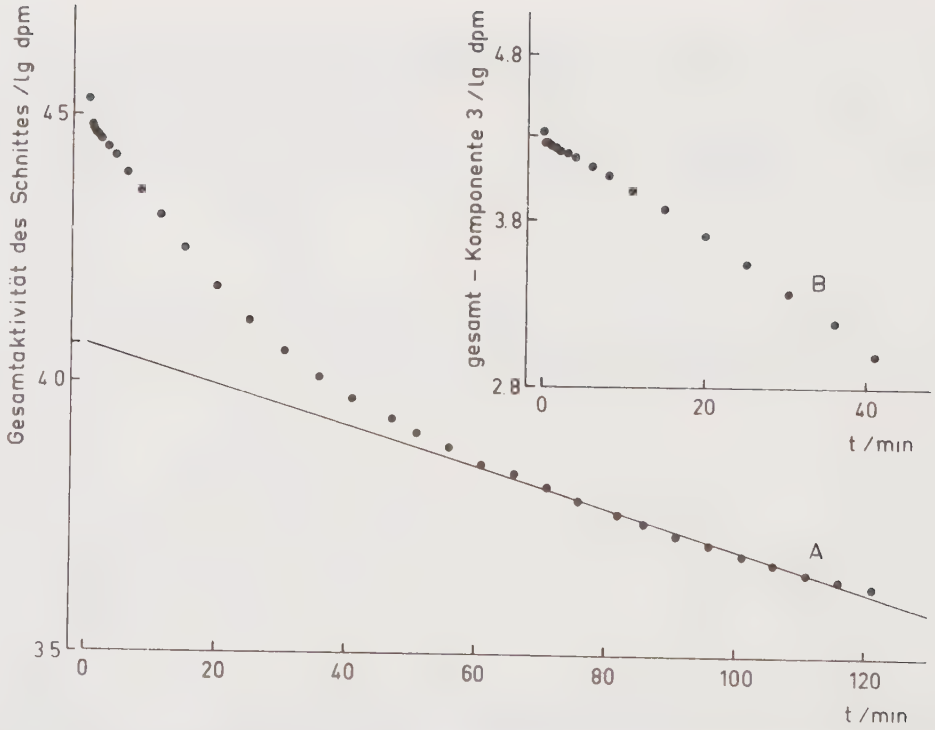

Abb. 19 a $^{36}Cl^-$-Abgabe eines frisch gefertigten Flexortangentialschnittes nach 47,5 h Inkubation via Transpirationsstrom

A: gesamter $^{36}Cl^-$-Gehalt im Schnitt (lg dpm) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min)

B: Nach Abzug der Komponente 3 von der Gesamtaktivität zu verschiedenen Zeiten bleibt nur die Komponente 2. Die "von Hand" Auswertung ergibt: I_2 = 20308 dpm, k_2 = 0,070 min^{-1}, I_3 = 11864 dpm, k_3 = 0,0087 min^{-1}.

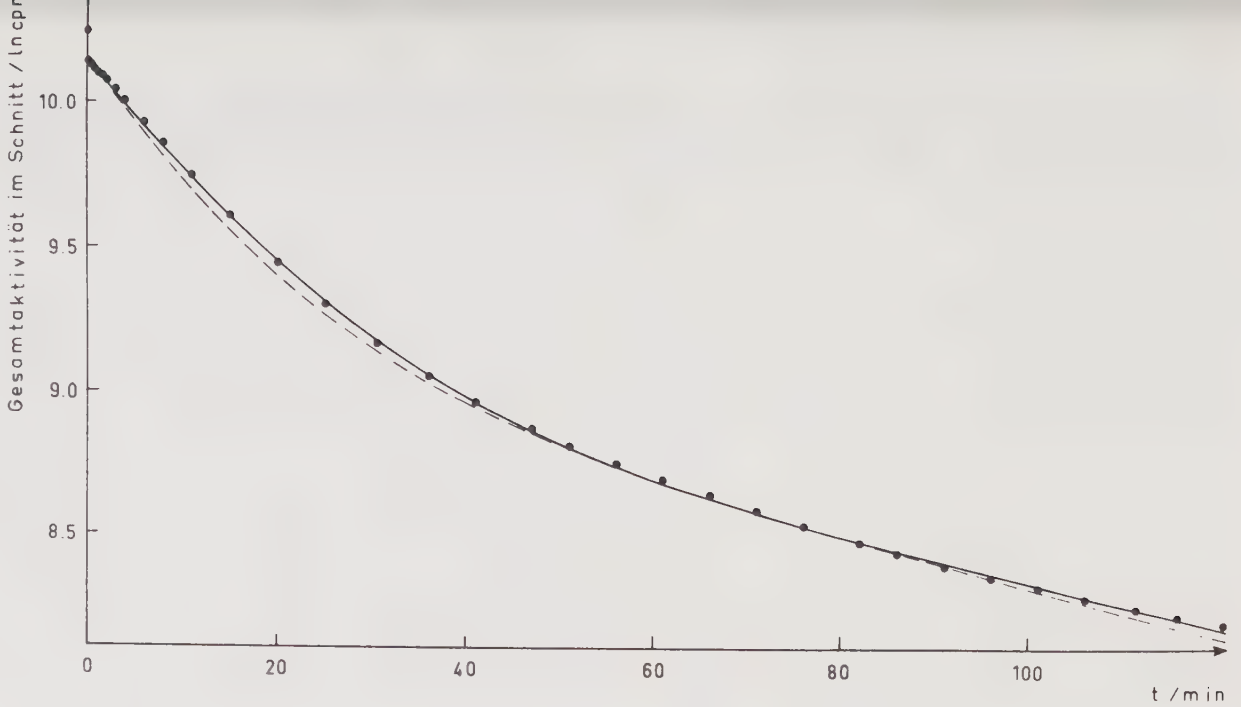

Abb. 19 b Computerplot desselben $^{36}Cl^-$-Effluxexperiments
Die gestrichelte Kurve ist nach den aus dem Graph der Abb. 19 a ermittelten I- und k-Werten geplottet (die Werte wurden dem Rechner zur Orientierung eingegeben). Die durchgezogene Kurve ist die optimal angepaßte Kurve an die zugrundeliegenden Meßwerte. Das Rechnerprogramm liefert drei Komponenten, wobei k_i und k_{ii} dieselbe Komponente 2 beschreiben: I_3 = 11346 cpm, k_3 = 0,0083 min^{-1}, I_i = -78582 cpm, k_i = 0,038 min^{-1}, I_{ii} = 92882 cpm, k_{ii} = 0,042 min^{-1}. $I_{ii} + I_i$ = 14300 cpm = I_2, k_{ii} und k_i entsprechen dem k_2-Wert.

	Inkubationsdauer via Transpiration		Frischgewicht (mg)	Trockengewicht (mg)	I_1 dpm	k_1 min^{-1}	I_2 dpm	k_2 min^{-1}	I_3 dpm	k_3 min^{-1}	eingesetzte Aktivität (mol Cl^-/ dpm)	Korrekturfaktor	Gesamtaktivität im Schnitt (dpm·mg^{-1}TG)	
Nachtstellung	2.0 h	Ex	5.39	0.29	119	1.10	154	0.17	473	0.0087	$2.05 \cdot 10^{-12}$	1.03	3019	40'-Efflux
		Flex+LB	8.61	0.87	236	1.69	793	0.19	3219	0.0035			5372	
	4.6 h	Ex	6.91	0.38	1868	0.75	2886	0.066	1779	0.0069	$1.81 \cdot 10^{-12}$	0.91	24442	45'-Efflux
		Flex	4.39	0.45	1456	1.25	7095	0.062	6589	0.0016			40545	
	5.0 h	Ex		~0.48	260	1.48	377	0.11	733	0.0039	$1.94 \cdot 10^{-12}$	0.98	3081	35'-Efflux
		Flex	3.83	0.30	140	1.71	2584	0.027	1072	-0.01			13691	
	6.3 h	Ex	3.85	0.22	457	0.93	1190	0.099	1265	0.0019	$2.02 \cdot 10^{-12}$	1.02	18165	
		Flex	7.09	0.57	378	1.76	2025	0.035	6748	0.0025			17348	
	16.7 h	Ex	3.82	0.19	2762	0.67	3636	0.065	2359	0.0010	$1.98 \cdot 10^{-12}$	1.00	60419	
		Flex	3.52	0.25	1468	1.95	9875	0.053	14241	0.0019			113621	
	17.3 h	Ex	4.29	0.29	1551	0.88	2935	0.054	1698	0.0005	$1.88 \cdot 10^{-12}$	0.95	25157	
		Flex	3.35	0.23	-	-	12513	0.057	6069	0.0012			95483	
	25.0 h	Ex	4.13	0.28	4793	0.86	14739	0.047	14700	0.0078	$1.77 \cdot 10^{-12}$	0.89	120182	
		Flex	3.08	0.33	-	-	20217	0.060	25675	0.017			140851	
	28.0 h	Ex	5.39	0.26	2522	0.82	6501	0.059	4602	0.0041	$1.98 \cdot 10^{-12}$	1.00	61908	
		Flex	5.25	0.34	-	-	15422	0.049	12045	0.0017			86262	
	41.3 h	Ex	2.57	0.15	3457	1.42	11705	0.090	3872	0.0016	$2.05 \cdot 10^{-12}$	1.03	159853	
		Flex	2.26	0.15	3362	3.73	26764	0.077	7138	0.0021			307739	
	47.5 h	Ex	4.16	0.24	14058	0.63	10369	0.085	9685	0.0037	$1.98 \cdot 10^{-12}$	1.00	164958	
		Flex	2.67	0.17	-	-	17229	0.047	13670	0.0083			199643	
	?	Ex	7.14		1038	0.79	7670	0.038	7202	0.0015	?	-	-	
		Flex	3.50		-	-	12972	0.087	2547	0.0044		-	-	
Tagstellung	11.0 h	Ex	5.31	0.23	1570	0.49	5625	0.044	9070	0.0011	$1.81 \cdot 10^{-12}$	0.91	73289	
		Flex	4.67	0.24	851	1.51	21836	0.012	10	- 0.17			93171	bei 27' Schnitt verrückt ⇒ Sprung in Kinetik
	25.0 h	Ex	5.16	0.34	4476	0.83	10921	0.069	18410	0.0021	$3.38 \cdot 10^{-12}$	1.71	196346	
		Flex	1.88	0.20	1001	0.60	9959	0.046	7435	0.0015			172691	
	27.0 h	Ex	3.52	0.20	1005	0.38	28369	0.058	8047	0.0017	$1.77 \cdot 10^{-12}$	0.89	209030	
		Flex	5.15	0.32	1920	3.08	16932	0.057	43723	0.0035			194636	bei 50' Schnitt besser benetzt ⇒ Kinetiksprung
	29.2 h	Ex	5.60	0.26	2725	1.50	30858	0.058	18094	0.0027	$1.81 \cdot 10^{-12}$	0.91	201909	
		Flex+LB	6.37	0.46	3838	7.48	34089	0.041	36647	0.0020			155087	

Tab. 5 Zusammenstellung aller $^{36}Cl^-$-Auswaschexperimente
Die durch die Aufsplittung der Effluxkurven erhaltenen Aktivitätsgehalte I der Kompartimente 1 - 3; dazugehörige Geschwindigkeitskonstanten k_1, k_2, k_3; Korrekturfaktor, weil zur Berechnung der Gesamtaktivität im Schnitt auf eine bevorzugte, eingesetzte Aktivität $1{,}98 \times 10^{-12}$ mol Cl^-/dpm umgerechnet werden muß.

Der Vorteil der durchgeführten Computerauswertung von Effluxkinetiken wird ersichtlich, wenn man Abb. 20 ansieht. Ein weniger als ca. 100 Minuten lang durchgeführtes Effluxexperiment oder eines, bei dem der Schnitt währenddessen in der Küvette gedreht oder besser benetzt wurde - was die Kinetik veränderte -, ist "von Hand" nach dem Subtraktionsverfahren nicht auswertbar, da die langsamste Komponente 3 noch nicht als Gerade erkennbar und extrapolierbar ist. Der Rechner hingegen ermittelt eine beste Lösung für alle drei Komponenten; jedoch sieht es so aus (Tab. 5), daß zur Vermeidung von unsinnigen Geschwindigkeitskonstanten k_3 (anderes Vorzeichen) und, um mit lange laufenden Effluxexperimenten übereinstimmende Geschwindigkeitskonstanten k_2 zu erhalten, der Auswaschversuch mindestens 45 Minuten lang laufen muß.

4.2.2. Influxkinetik von $^{36}Cl^-$ in das Extensor- und Flexorgewebe via Transpirationsstrom

$^{36}Cl^-$ wurde in vielen Versuchsansätzen unterschiedlich lange über den Transpirationsstrom angeboten. Folglich wurden das Zellwandkompartiment und alle zellulären Kompartimente des Extensor- und Flexorgewebes mehr oder weniger radioaktiv markiert. Schließlich geht die experimentell zu ermitttelnde Aufnahmekinetik in die Sättigung über, d. h. auch im langsamsten Kompartiment 3 hat sich dasselbe Verhältnis von radioaktiven Cl^--Ionen zu Gesamtmenge an Cl^--Ionen eingestellt, das in der Inkubationslösung vorgegeben ist. Die Spezifität (eben dieses Verhältnis) ist dann gleich 1.

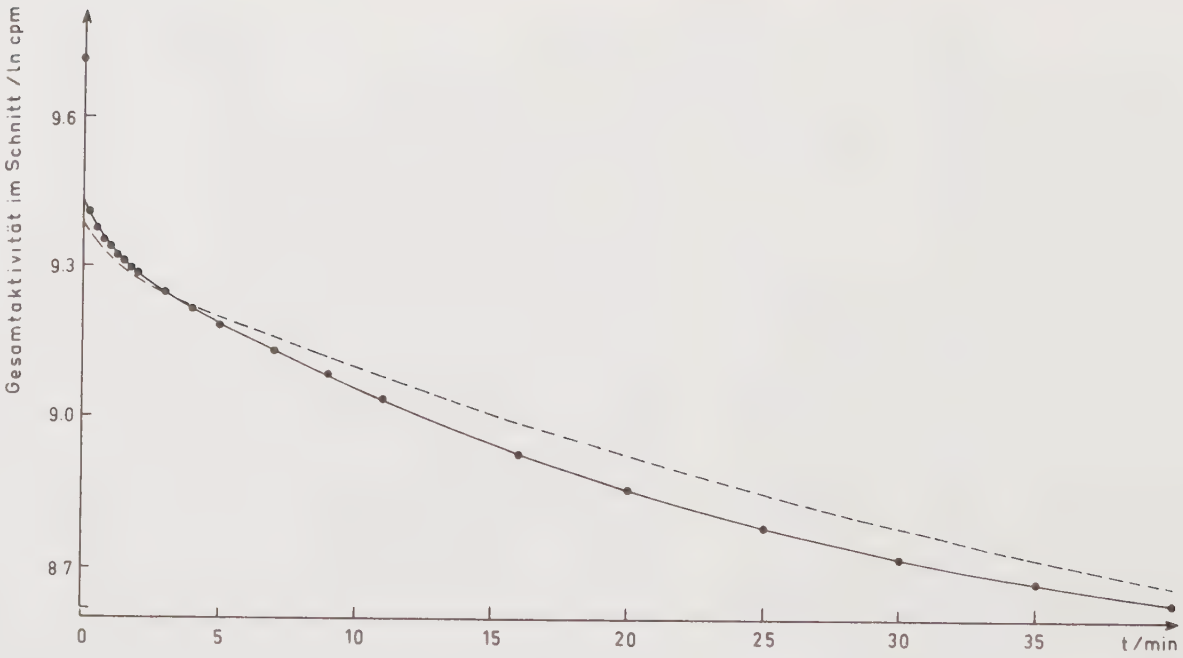

Abb. 20 $^{36}Cl^-$-Abgabe eines frisch gefertigten Flexortangentialschnitts nach 46 h Inkubation via Transpirationsstrom in Abhängigkeit von der Zeit nach Auswaschbeginn.
Der Effluxversuch wurde nur 45 min lang durchgeführt. Computeranpassung (durchgezogene Kurve), nachdem geschätzte I- und k-Werte (I_1 = 1000 cpm, k_1 = 1,0 min^{-1}, I_2 = 6000 cpm, k_2 = 0,04 min^{-1}, I_3 = 5000 cpm, k_3 = 0,002 min^{-1}) dem Rechner vorgegeben worden waren (gestrichelte Kurve), mit folgendem Ergebnis: I_1 = 1208 cpm; k_1 = 1,25 min^{-1} ; I_2 = 5589 cpm; k_2 = 0,062 min^- ; I_3 = 5469 cpm; k_3 = 0,0016 min^{-1}.

Abb. 21 zeigt die Influxkinetiken von Extensor und Flexor in situ. Alle Influxexperimente wurden jeweils in der maximalen Nachtstellung der Blätter abgebrochen. Die Computeranpassung der Meßwerte (Gesamtaktivität im Schnitt in Tab. 5) in die Form $y(t) = y^{\infty}(1 - e^{t/\tau})$ ergibt für die $^{36}Cl^-$-Aufnahme in das Extensorgewebe in situ eine Zeitkonstante τ_{Ex} = 270 h und einen Sättigungswert y^{∞}_{Ex} = 1073871 dpm/mg TG, und entsprechend in das Flexorgewebe eine Zeitkonstante τ_{Flex} = 166 h und einen Sättigungswert y^{∞}_{Flex} = 1032136 dpm/mg TG. Die Streuung der Meßpunkte ist sehr groß. Der Grund dafür kann sein, daß die Schnelligkeit der "Aufnahmekinetik" jedes einzelnen, aufgearbeiteten Blattgelenks mit der Größe der benachbarten Blattfläche und deren Wasseraufnahme/Wasserabgabe stark variiert. Mit einem ungefähren Flüssigkeitsvolumen von 10 µl/mg TG (Tab. 16, TG/FG-Verhältniss) errechnet sich aus den Sättigungswerten y^{∞} der Influxkinetiken eine über alle Kompartimente gemittelte Cl^--Konzentration im Extensor von 213 mM und im Flexor von 204 mM.

Wenn man sich an den Effluxergebnissen orientiert und mit einer Aufladezeit von 5 x τ_3 (Zeitkonstante des langsamsten Zellkompartiments) rechnet - danach sollten 99 % des Cl^- im Gewebe markiert sein - und mit einer zusätzlichen Latenzzeit von schätzungsweise 1,5 h, weil das $^{36}Cl^-$ einen Weg von rund 6 cm im Blattstiel zurücklegen muß - nach zwei Stunden Inkubation ist $^{36}Cl^-$ im Extensor und Flexor nachweisbar -, würde die Aufladezeit maximal ungefähr 85 h betragen. Aber schon die durch Computeranpassung erhaltenen Zeitkonstanten für die in situ Markierung sind 2 - 3,2mal größer. Das kann bedeuten, daß das Blattstielgewebe als unbekannter Faktor die Aufladung im Gelenk stark verzögert, aber auch daß die Cl^--Flüsse über die Membranen im intakten Gelenk und in frisch geschnittenem, verletztem Gelenkgewebe unterschiedlich groß sind. Dieser methodische Fehler (Membranflüsse bei frischen Schnitten nicht im steady state) war doch von Beginn an erwartet und akzeptiert worden.

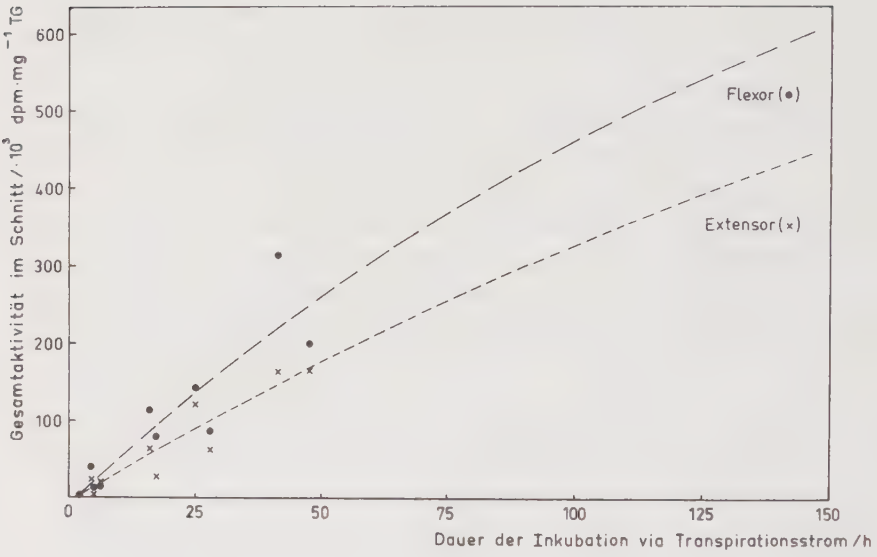

Abb. 21 $^{36}Cl^-$-Influxkinetik von in situ Extensor- und Flexorgewebe via Transpirationsstrom.
Originalmeßwerte (Gesamtaktivität der Schnitte/dpm·mg^{-1} TG, korrigiert auf eine einheitliche Aktivität von 1,98 x 10^{-12} mol Cl^-/dpm, Tab. 5) und computerermittelte Kinetik der Form $y(t) = y^{\infty}(1 - e^{t/\tau})$ für Extensor (X) und Flexor (•). τ ist die Zeitkonstante der exponentiell verlaufenden Aufnahmekinetik, y^{∞} ist der schließlich erreichbare Sättigungswert der Radioaktivität im Schnitt (alle Kompartimente sind mit $^{36}Cl^-$ durchmarkiert). Folgende Werte wurden ermittelt: τ_{Ex} = 270 h, τ_{Flex} = 166 h, y^{∞}_{Ex} = 1073871 dpm/mg TG, y^{∞}_{Flex} = 1032136 dpm/mg TG. Es wurde eine Latenzzeit von 1,5 h angenommen.

4.2.3. Cl^--Konzentrationen in der Extensor- und Flexorzellwand?

Die Vermutung lag nahe, daß die schnellste Komponente 1 bei den $^{36}Cl^-$-Effluxexperimenten das Zellwandkompartiment wiedergibt. Für Inkubationszeiten zwischen 16 und 47 h wird aus den Aktivitätsgehalten der Komponente 1 (I_1 in Tab. 5) eine mittlere Cl^--Menge von 0,039 $\pm$ 0,013 µmol/mg TG berechnet (n = 8; Extensor- und Flexorergebnisse zusammen; Nachtstellung). Das ergibt eine Cl^--Konzentration von 130 mM (Volumen der Zellwand = 0,30 µl/mg TG aus Tab. 16). Diese Cl^--Konzentration würde im WFS der Zellwand enthalten sein; denn der DFS schließt Anionen aus. Wenn noch berücksichtigt wird, daß bei allen experimentellen Inkubationszeiten in Tab. 5 erst Spezifitäten zwischen 0,0018 und 0,16 im Extensorgewebe und Spezifitäten zwischen 0,003 und 0,24 im Flexorgewebe erreicht worden sind - und das gilt vielleicht auch für das sehr schnell austauschende Kompartiment 1 -, dann ergeben sich beinahe die 4 - 9fachen Mengen und Konzentrationen von Cl^- in Kompartiment 1 (Tab. 6). Die errechneten Cl^--Konzentrationen sind für die Zellwand, aus der der Theorie nach Anionen großenteils ausgeschlossen werden, sehr groß bzw. zu groß. Denn die in Tab. 6 genannten Konzentrationen würden gar die für das ganze Extensor- und Flexorgewebe bestimmten Ionenkonzentrationen von ca. 210 mM übersteigen (4.2.2.). Diese Problematik wird später diskutiert. Hier sei nur wiederholt, daß bei fünf Flexorkinetiken diese schnellste Komponente ganz fehlt.

	Cl^- - Gehalt des Komp. 1 im Extensor (µmol $Cl^- \cdot mg^{-1}TG$)	Cl^- - Gehalt des Komp. 1 im Flexor (µmol $Cl^- \cdot mg^{-1}TG$)	resultierende Cl^- - Konzentration im Extensor (mM)	resultierende Cl^- - Konzentrat im Flexor (mM)
Nacht	0.36 ± 0.06 n = 10	0.16 ± 0.04 n = 6	1125	571
Tag	0.29 ± 0.09 n = 4	0.11 ± 0.02 n = 3	1261	344

Tab. 6 Cl^--Gehalte und Cl^--Konzentrationen des Kompartiments 1 bei maximal erreichter Spezifität von 1; Berechnung der Cl^--Konzentrationen mit Zellwandvolumina aus Tab. 16.

4.2.4. Weitere Aktivität abgebende Kompartimente beim $^{36}Cl^-$-Efflux

Von den zwei weiteren Flußkomponenten der $^{36}Cl^-$-Experimente (Tab. 7) stimmte die Komponente 2 in ihrer Zeitkonstante (τ_2 = 17,2 min für Extensorschnitte, τ_2 = 19,0 min für Flexorschnitte) sehr gut mit der in der Literatur genannten, mittleren Komponente von dreiphasigen $^{36}Cl^-$-Effluxkinetiken überein (Wurzelgewebe von Möhren 16,9 min, CRAM 1968; Thalli von Riccia 19,2 min, FELLE 1974; Acetabularia 18,7 min, MUMMERT 1979). Die Zeitkonstante der langsamsten Komponente 3 liegt im Bereich von Stunden (τ_3 = 7,6 h für Extensor- und Flexorschnitte aus Tag- bzw. Nachtstellung) und ist ebenso den in der Literatur genannten, größten Zeitkonstanten ähnlich (Wurzelgewebe von Möhren 136 h, Thalli von Riccia 13,5 h, Acetabularia 2,7 h), wobei immer berücksichtigt werden muß, daß die Größe des Kompartiments die totale Dauer der Radioaktivitätsabgabe mitbestimmt. In der zitierten Literatur werden jene Zeitkonstanten dem Cl^--Austausch am Plasmalemma und am Tonoplasten (in Serie) bzw. der Abgabe aus Cytoplasma und Vakuole als komplexe Einheit (in Serie und zusätzlich Vesikeltransport) zugeordnet.

	τ_2/ min Komp. 2	τ_3/ h Komp. 3	rel. Verhältnis der Radioaktivitätsmengen in den Flußkomponenten 2 und 3 $I_2 : I_3$
Extensor	16.2 ± 1.3 n = 14	7.52 ± 1.3 n = 14	1 : 1.06 ± 0.19 n = 15
Flexor	19.0 ± 1.4 n = 12	7.69 ± 1.0 n = 12	1 : 1.03 ± 0.26 n = 11

Tab. 7 Zeitkonstanten (Mittelwerte ± SF) und relative Verhältnisse (± SF) der Radioaktivitätsmengen der Flußkomponenten 2 und 3 bei $^{36}Cl^-$-Effluxversuchen

Bei den hier genannten Versuchen sind die Komponenten nicht zuverlässig zu identifizieren, weil
1. die Grundvoraussetzung der Compartmentanalyse - Ionenflüsse im steady state - nicht gewährleistet war,
2. das Gewebe nicht "durchgeladen" war (Spezifität $\ll 1$),
3. die Schnitte sofort mit Beginn des Auswaschens ihr(e) Länge/Volumen in der 20 mOsm Auswaschlösung um ca. 43 % änderten (3.4.2.5.2.).

Auffällig ist, daß im Mittel in den Kompartimenten 2 und 3 die gleichen Aktivitätsmengen enthalten sind (Tab. 7).

4.2.5. Efflux von $^{86}Rb^+$

In Abb. 22 a und b ist eine typische $^{86}Rb^+$-Auswaschkinetik dargestellt. Genauso zeigen auch alle anderen, durchgeführten Experimente eine Kinetik aus drei Komponenten (n = 15, Tab. 8). Die Zeitkonstanten der schnellsten Komponente 1 liegen zwischen 0,37 und 4,3 min (Mittelwert ± SF: 1,32 ± 0,30 min, n =14; Extensor- und Flexorschnitte zusammen genommen, weil sich weder zwischen Extensor und Flexor noch zwischen den beiden unterschiedlichen Auswaschlösungen 1/10 S_1 und S_1 signifikant unterschiedliche Zeitkonstanten ergeben). Die Zeitkonstanten der Komponente 2 liegen zwischen

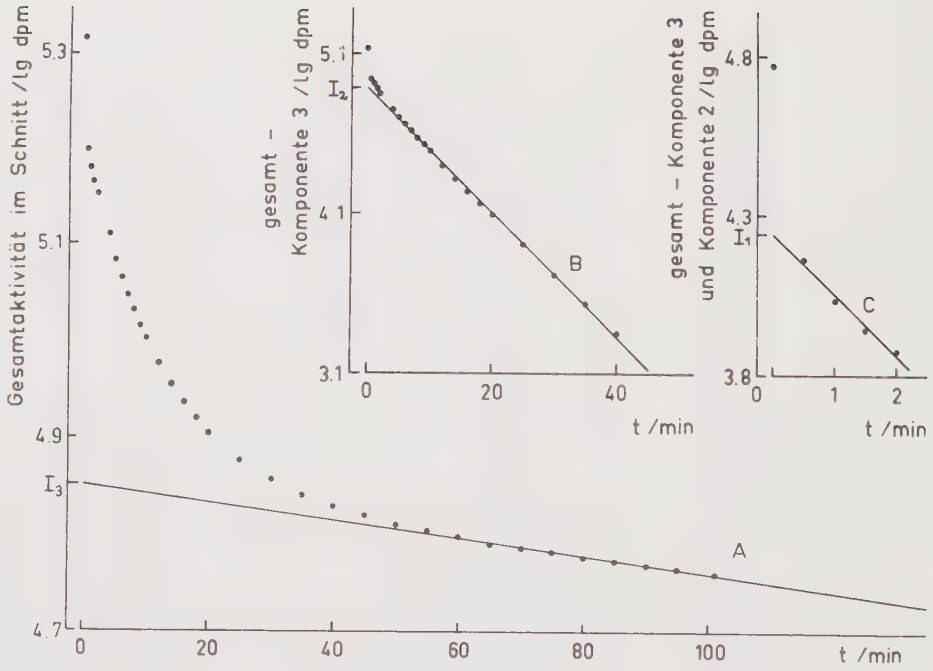

Abb. 22 a $^{86}Rb^{+}$-Abgabe eines frisch angefertigten Flexortangentialschnittes
A: gesamter $^{86}Rb^{+}$-Gehalt im Schnitt (lg dpm) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min)
B: $^{86}Rb^{+}$-Gehalt der Komponente 1 und der Komponente 2 in Abhängigkeit von der Auswaschzeit
C: $^{86}Rb^{+}$-Gehalt der Komponente 1 in Abhängigkeit von der Auswaschzeit
Die "von Hand" Auswertung ergibt folgende Werte: I_1 = 17418 dpm, k_1 = 0,18 min^{-1}, I_2 = 76155 dpm, k_2 = 0,039 min^{-1}, I_3 = 71121 dpm, k_3 = 0,0021 min^{-1}.

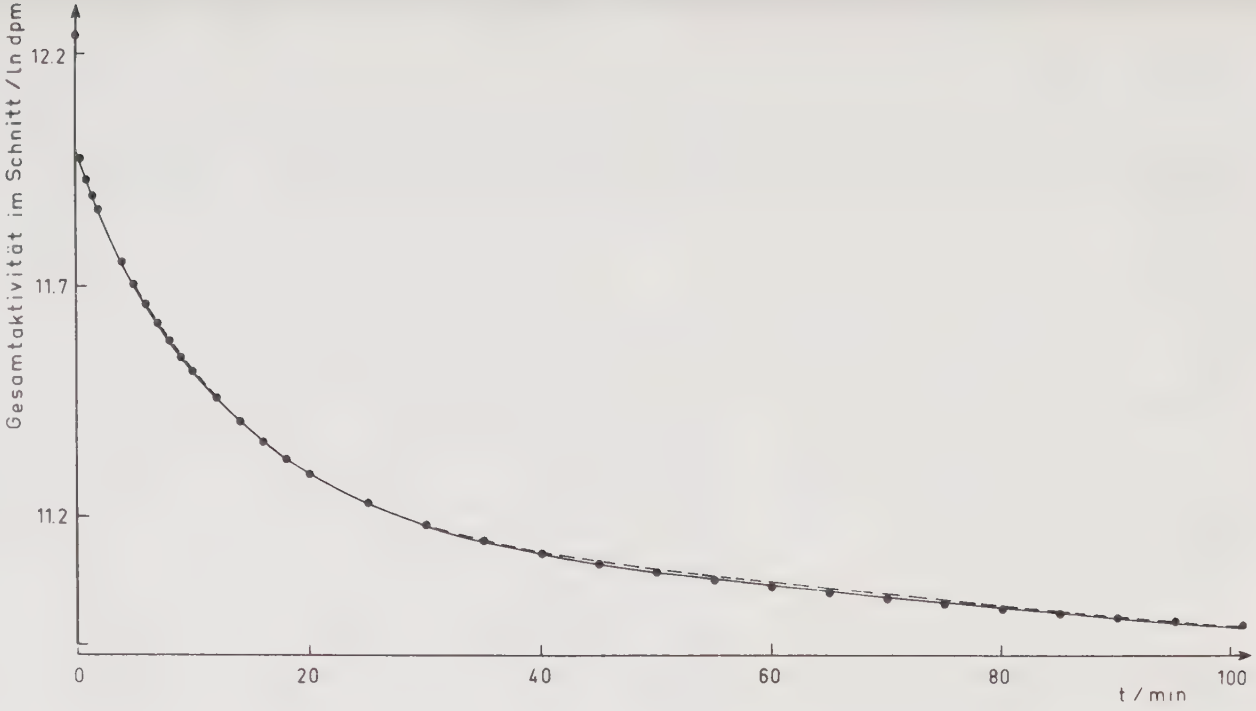

Abb. 22 b Computerplot desselben $^{86}Rb^{+}$-Effluxexperiments
Die durchgezogene Kurve ist der beste Computerfit, dem folgende berechnete Daten zugrundeliegen: I_1 = 19026 dpm, k_1 = 0,35 min^{-1}, I_2 = 73982 dpm, k_2 = 0,0897 min^{-1}, I_3 = 71054 dpm, k_3 = 0,0021 min^{-1}. Die gestrichelte Kurve ist gezeichnet nach den dem Rechner zur Orientierung vorgegebenen I- und k-Werten, die nach der Splitmethode in Abb. 22 a erhalten wurden. Die Übereinstimmung ist sehr gut. Meßpunkt bei t = 0 min ist bei Kurvenanpassung weggelassen.

	Phasenlage	Inkubation via Transp.		k_1 min^{-1}	I_1 dpm	k_2 min^{-1}	I_2 dpm	k_3 min^{-1}	I_3 dpm	Frischgewicht mg	Trockengew. berechnet mg	eingesetzte Aktivität mol K^+/ dpm	
Hebung	5 h	23.0 h	Ex	0.90	40473	0.10	67540	0.0073	48274	6.46	0.35	$0.727 \cdot 10^{-13}$	
			Flex	0.35	19026	0.089	73982	0.0021	71054	5.16	0.40		
	6.5 h	26.0 h	Ex	0.81	22990	0.10	36549	0.0156	30373	4.87	0.27	$1.082 \cdot 10^{-13}$	
			Flex	1.74	5913	0.089	52089	0.0067	30180	-	~0.41		
	5.5 h	32.5 h	Ex	0.48	9916	0.14	11350	0.014	17324	4.98	0.27	$1.270 \cdot 10^{-13}$	mit S_1 ausgewaschen
			Flex+LB	0.64	15555	0.097	19423	0.0026	58574	7.38	0.57		
	8.5 h	29.0 h	Flex	0.23	45401	0.055	28051	0.0039	38378	4.75	0.37	$1.082 \cdot 10^{-13}$	
	10.1 h	24.5 h	Flex	2.13	20169	0.15	38139	0.0072	125323	9.41	0.73	$1.067 \cdot 10^{-13}$	bei Ex zwei spontane Sprünge in der Kinetik
	11.6 h	26.6 h	Ex	1.32	11447	0.18	21022	0.0045	39886	-	0.40	$1.310 \cdot 10^{-13}$	
	19.2 h	17.0 h	Ex	0.91	22865	0.12	20720	0.0091	14926	7.07	0.38	$0.727 \cdot 10^{-13}$	mit S_1 ausgewaschen
			Flex	2.69	3701	0.081	31118	0.0026	29450	5.53	0.43		
Nacht Tag	~28 h	30.5 h	Ex	1.07	4722	0.13	12621	0.0071	22834	4.67	0.25	$1.270 \cdot 10^{-13}$	mit S_1 ausgewaschen
			Flex	1.83	15583	0.081	14019	0.0019	25731	4.98	0.39		
	~28 h	41.5 h	Ex	1.74	17947	0.080	97398	0.0095	79279	7.83	0.42	$1.067 \cdot 10^{-13}$	
			Flex	0.68	39650	0.084	46027	0.011	69932	4.11	0.32		

Tab. 8 Zusammenstellung aller $^{86}Rb^+$-Auswaschexperimente
Phasenlage der Blattgelenke; Geschwindigkeitskonstanten k und Aktivitätsgehalte I der Kompartimente 1 - 3; die Schnitte wurden mit 1/10 S oder, wo extra aufgeführt, mit S_1 ausgewaschen; die eingesetzte Aktivität ist so berechnet, daß $^{86}Rb^+$ nur Tracer für K^+-Ionen ist.

5,55 und 18,0 min (Mittelwert 10,37 $\pm$ 0,86 min, n = 14). Und das langsamste Kompartiment 3 tauscht das radioaktive Rb^+-Ion mit Zeitkonstanten zwischen 1,07 und 8,77 h aus (Mittelwert 3,42 $\pm$ 0,67 h, n = 14). Die Zeitkonstanten gleichen damit in der Größenordnung denen von Cl^-. Und wieder liegt nahe, die Komponente 1 dem Zellwandkompartiment zuzuordnen, die Komponente 2 dem Cytosol und die Komponente 3 der Vakuole.

Wegen der komplizierten Zusammensetzung der $^{86}Rb^+$-1/10 S_1-Lösung wird $^{86}Rb^+$ in der Zellwand ein Tracer für alle drei enthaltenen Kationen K^+, Na^+ und Ca^{2+} sein. Falls die angebotene, radioaktive $^{86}Rb^+$-1/10 S_1-Lösung in der gegebenen Zusammensetzung in der Extensor- und Flexorzellwand ankommt, wird sie den WFS füllen; im DFS werden folglich Na^+ und K^+ annähernd im Verhältnis 9 : 1 gebunden werden, Ca^{2+} jedoch wird den beiden vorgezogen werden. Es hängt von den Konzentrationsverhältnissen ab, welcher Anteil der negativen Festladungen von Ca^{2+} abgesättigt wird. Für das gegebene Verhältnis Ca^{2+} : (Na^+ + K^+) = 1 : 100 wird aus Literaturdaten berechnet, wieviel Prozent der negativen Festladungen der Zellwände durch Ca^{2+} abgesättigt sein könnten: bei WALKER, PITMAN (1976) werden bei logarithmischer Auftragung 36 % extrapoliert, bei DEMARTY et al. (1977) wird ein Wert von ungefähr 65 % bestimmt und bei DEMARTY et al. (1978) werden ca. 31 % durch Extrapolation ermittelt.

Aus den Experimenten ergibt sich folglich, falls das Kompartiment 1 die Zellwand darstellt und falls sie durchmarkiert ist (Spezifität = 1), und wenn $^{86}Rb^+$ erstmal nur als Tracer für K^+ und Na^+ angenommen wird, ein mittlerer Gehalt an einwertigen Kationen im Kompartiment 1 von 0,056 $\pm$ 0,01 µmol/mg TG (n = 14). Wegen der geringen Zahl der Versuche sind alle Phasenlagen, Inkubationszeiten, Extensor und Flexor zusammengefaßt. Wenn $^{86}Rb^+$ als Tracer für K^+, Na^+ und auch Ca^{2+} angesehen wird, erhöht sich der Wert auf 0,056 + (0,056 : 0,65 · 0,35) = 0,085 µequiv Kationen/mg TG bei 35 % Absättigung durch Ca^{2+} bzw. 0,17 µequiv Kationen/mg TG bei 65 % Absättigung. Alle Werte sind größer als der in 4.2.3. ermittelte Wert für den Cl^--Gehalt in der "Zellwand" (0,039 µmol Cl^-/mg TG, Anionenequivalente). Das deutet an,

daß $^{86}Rb^+$ nicht nur wie Cl^- aus dem WFS kommt, sondern auch im DFS der Zellwand ausgetauscht und daraus ausgewaschen wird. Es ist ein fragwürdiges Ergebnis, weil unklar ist, ob die angebotene Inkubationslösung mit dreierlei Kationen unverändert in der Zellwand der Blattgelenke ankommt.

Als Hauptresultat bleibt jedoch unzweifelhaft, daß in der Zellwand der Gehalt an Kationen größer ist als der an Anionen. Zur Klärung der offen gebliebenen Fragen, welche Kationenspezies und welche Mengen davon in situ in der Zellwand vorkommen und ob möglicherweise Unterschiede im Tagesgang auftreten, wurden ähnliche Experimente durchgeführt, bei denen jedoch eine vorherige Inkubation in eine radioaktive Lösung nicht notwendig war.

4.3. Kationengehalt der Extensorzellwand

4.3.1. Beispiele für Auswaschkinetiken

In Abb. 23 sind drei Beispiele einer K^+-Auswaschkinetik von Tangentialschnitten aus dem Extensorgewebe abgebildet. Der Verlauf der Gesamtkinetik (K^+-Austausch in der Zellwand und am Plasmalemma), also die zeitliche Abnahme der K^+-Konzentrationen der aufeinanderfolgenden, gesammelten Eluate ist durch Punkte wiedergegeben. Da beide Austauschvorgänge, der in der Zellwand und der am Plasmalemma, exponentiell verlaufen, ist es bei halblogarithmischer Auftragung möglich, die beiden Komponenten voneinander zu trennen, wenn die beiden zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten genügend unterschiedlich sind. Tatsächlich ist in Abb. 23 a und 23 b die Gerade für den langsameren Austausch am Plasmalemma deutlich auszumachen. Und nach einem zusätzlichen Rechenschritt (Subtraktion) erhält man auch die schnellere Kinetik der Zellwand. In Abb. 23 c ergibt sich die Zellwandkinetik gleich aus dem Experiment, da die K^+-Flüsse aus dem Symplasten sehr gering sind (K^+-Konzentrationen $<0{,}6$ µM; also nicht mehr exakt zu bestimmen). Sie konnten vernachlässigt werden. Eine weitere Ausplittung in mehrere symplastische Komparti-

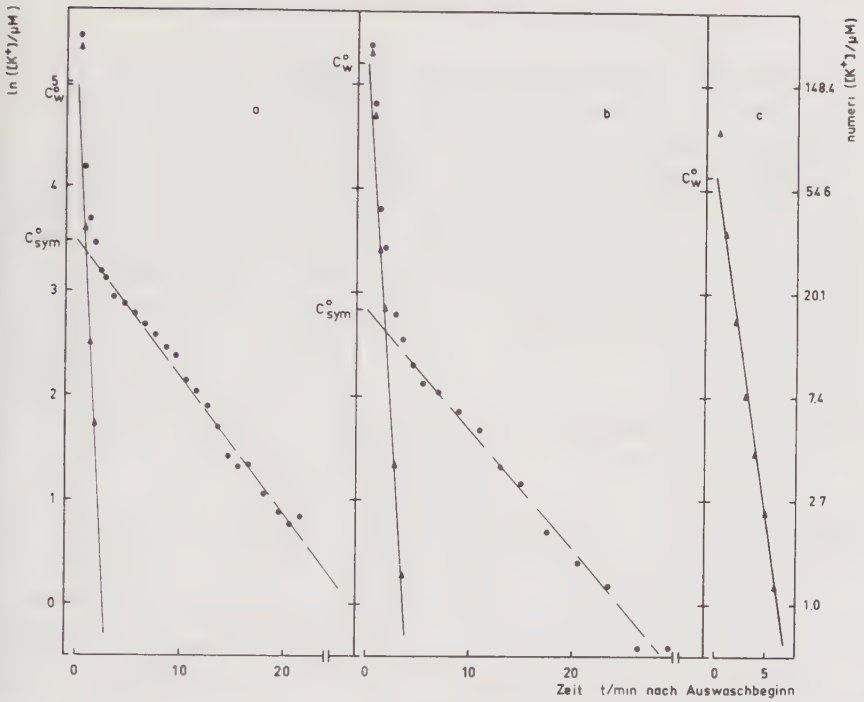

Abb. 23 Drei Beispiele einer K^+-Austauschkinetik von Extensortangentialschnitten

a Drei frische Extensorschnitte aus der Tagstellung wurden sofort nach dem Schneiden zusammen in der gekühlten Auswaschküvette mit gekühlter 200 mM LiCl, 50 mM NaCl-Lösung ausgewaschen. Die K^+-Konzentrationen der gesammelten Eluate (6 x 30 sec, 19 x 1 min-Intervalle) sind als Punkte (—●—●—) gegen die Zeit aufgetragen. Die steilere durchgezogene Gerade (—▲—▲—) ist die Austauschkinetik der Zellwand; sie ergibt sich aus der Differenz der Numeri zwischen der Gesamtkonzentration und der durch Extrapolation ermittelten Konzentration der Symplastenkinetik zu bestimmten Zeitpunkten. Aus ln C^o_w und der Steigung der Geraden läßt sich der K^+-Gehalt des Zellwandkompartiments berechnen.

b 1 x 2 und 1 x 3 frische Extensorschnitte aus der Nachtstellung wurden mit 230 mM LiCl, 1 mM $CaCl_2$ in der Kälte nacheinander ausgewaschen; wieder halblogarithmische Auftragung der K^+-Konzentration gegen die Zeit (6 x 30 sec, 3 x 1 min, 5 x 2 min, 5 x 3 min-Intervalle). Diese Auswaschlösung ermöglichte es, im selben Versuch auch Na^+ neben K^+ zu bestimmen.

c Drei frische Extensorschnitte aus der Tagstellung waren 85 min lang inkubiert in 10 mM KCl, 10 mM Tris, mit HCl eingestellt auf pH 8,5, bei Zimmertemperatur, bei Licht und mäßigem Schütteln. Danach wurden sie in der gekühlten Küvette ausgewaschen mit kalter 5 mM LiCl, 5 mM NaCl, 10 mM Tris·HCl-Lösung, pH 8,7 (1 x 30 sec, 8 x 1 min, 10 x 2 min Intervalle). Bei solchen Versuchsbedingungen ist die Auswaschkinetik oft nur einphasig und von der Zellwand bestimmt.

mente (Cytosol, Vakuole, Chloroplasten) wurde nicht angestrebt, da die Auswaschmethode sowieso ein aufwendiger Kompromiß aus Zeit, Empfindlichkeit der photometrischen Konzentrationsbestimmung und sammelbaren Volumina ist. Uns interessiert hier in erster Linie der Kationengehalt der Zellwand, der aus der Zellwandkinetik nach Gleichung 5 in 3.4.2.3. berechnet wird. Der Vollständigkeit halber wurden aber auch die Symplastenkinetiken zur Bestimmung der Flüsse übers Plasmalemma formal analysiert.

4.3.2. In situ K^+-Gehalt der Extenxorzellwand im Tagesgang der Blattbewegung

Auswaschversuche mit hypotonischer Auswaschlösung :

Zu Beginn der Experimentenserie wurden die Auswaschversuche mit hypotonischer Auswaschlösung gemacht. Die Zellwandkinetik von frisch angefertigten und sofort mit 5 mM RbCl, 5 mM NaCl-Lösung ausgewaschenen Tangentialschnitten aus dem Extensor von drei Wochen alten Pflanzen konnte nur zum Teil bestimmt werden, weil die Kinetik wegen der Längenausdehnung der Schnitte oft gestört war (3.4.2.5.2.). Alle Experimente sind in Tab. 9 mit den zugehörigen Versuchsparametern zusammengestellt. Der resultierende K^+-Gehalt der Zellwand ist in der vorletzten Spalte rechts in der Tabelle aufgeführt. Für Schnitte aus der Tagstellung ergibt sich ein Mittelwert von 0,27 µmol K^+/mg TG $\pm$ 0,04 (n = 4); für die Nachtstellung stimmt nur der Wert 0,51 µmol K^+/mg TG mit Ergebnissen der gleich folgenden Auswaschversuche mit isotonischer Auswaschlösung überein, zwei Werte sind Ausreißer und fünf weitere Kinetiken waren nicht aufzusplitten. Für die Hebungsbewegung liegt der mittlere Gehalt von 0,31 µmol K^+/mg TG (n = 2) zwischen dem Tag- und Nachtgehalt. Wenn dem Blattgelenk über den Transpirationsstrom ungefähr einen Tag lang 10 mM KCl-Lösung angeboten worden war, senkte das den K^+-Gehalt der Extensorzellwand während der Tagstellung auf 0,09 µmol K^+/mg TG $\pm$ 0,02 (n = 3). Aus allen Versuchen zusammen wurde eine mittlere Reaktionskonstante $k_{sym} \pm SF$ für die K^+-Abgabe über das

	Trocken-gewicht (mg)	C^o_{sym} (µM)	k_{sym} (min^{-1})	C^o_w (µM)	k_w (min^{-1})	Auswasch-volumen (µl/min)	Auswaschlösung	K^+-Gehalt der Zellwand ($\frac{\mu mol}{mg\ TG}$)	Φ_{sym} ($\frac{\mu mol\ K^+}{mg\ TG\ min}$)
TAG	0.66	34.65	0.088	33.72	0.778	3150	0,2 mM $CaCl_2$	0.21	0.165
	0.80	29.37	0.05	105.79	2.066	3106	"	0.20	0.114
	0.89	25.17	0.029	86.84	1.016	3140	5 mM NaCl, 5 mM RbCl	0.31	0.089
	0.56	74.66	0.081	Sprünge	-	1650	"	-	0.22
	0.72	36.74	0.032	Plateau	-	1700	"	-	0.087
	-	Plateau	-	-	-	-	"	-	-
	-	Sprünge	-	-	-	-	"	-	-
	0.47	22.82	0.026	95.98	1.045	1785	"	0.35	0.087
TAG	0.46	16.56	0.048	21.82	0.542	1542	I: 10 mM KCl via Transpirationsstrom A: 5 mM RbCl,5 mM NaCl	0.13	0.055
	0.49	20.72	0.081	12.77	0.72	1765	"	0.064	0.075
	0.44	19.05	0.091	10.97	0.55	1810	"	0.082	0.078
HEBUNG	0.74	26.74	0.077	111.90	0.739	1750	I: 10 mM KCl via Transpirationsstrom A: 5 mM RbCl,5 mM NaCl	0.36	0.063
	0.60	33.85	0.047	55.15	0.601	1790	5 mM RbCl, 5 mM NaCl	0.27	0.10
NACHT	0.49	16.77	0.085	114.4	0.83	1810	I: 10 mM KCl via Transpirationsstrom A: 5 mM RbCl,5 mM NaCl	0.51	0.062
	0.45	54.98	0.07	956.90	2.93	1660	5 mM RbCl, 5 mM NaCl	1.20	0.20
	0.32	22.99	0.05	450.7	1.86	1550	"	1.17	0.11
	0.78	71.47	0.05	-	-	1850	"	-	0.17
	0.45	35.77	0.08	Sprung	-	1600	"	-	0.13
		vier weitere Experimente: Sprünge und Plateaus							

Tab. 9 Errechneter K^+-Gehalt der Zellwand und K^+-Fluß Φ_{sym} über das Plasmalemma von sofort nach dem Schneiden mit 20 mOsm Salzlösung ausgewaschenen Extensortangentialschnitten bei verschiedenen Blattpositionen

Aufgeführt sind alle beim Experiment ermittelten Parameter: das Trockengewicht der Schnitte, die aus den Ordinatenschnittpunkten der Symplastengeraden bzw. der Zellwandgeraden ermittelten Konzentrationen C^o_{sym} und C^o_w mit den zugehörigen Reaktionskonstanten k^o_{sym} und k^o_w, das Auswaschvolumen pro Minute, das Auswaschmedium.

I: bedeutet vorherige, ca. 24 h lang dauernde Inkubation des Extensors/Gelenks in 10 mM KCl via Transpirationsstrom

A: bedeutet sofortiges Auswaschen in der angegebenen Lösung

Plasmalemma von 0,062 $\pm$ 0,0059 min^{-1} errechnet; das ergibt eine Halbwertszeit von 11,18 min. Aus der mittleren Reaktionskonstanten k_w für die K^+-Abgabe aus der Zellwand von 0,89 $\pm$ 0,14 min^{-1} ergibt sich eine Halbwertszeit von 0,78 min.

Auswaschversuche mit isotonischer Auswaschlösung:

Die isotonische Auswaschlösung wurde verwendet, damit die Extensorschnitte nach dem Schneiden in der Auswaschlösung ihr(e) Länge/Volumen beibehielten. In Tab. 10 sind alle durchgeführten Experimente zusammengestellt (Salzlösungen 400 - 580 mOsm). Die Mittelwerte der K^+-Gehalte der Extensorzellwand in unterschiedlichen Blattpositionen sind in Tab. 11 aufgeführt. Es wird bestätigt, was sich bei den Versuchen mit der hypotonischen Auswaschlösung schon andeutete: der K^+-Gehalt in der Zellwand, bezogen aufs Trockengewicht, ist während der Tagstellung der Blätter gering, nämlich 0,22 µmol K^+/mg TG, in der Nachtstellung hingegen signifikant erhöht auf 0,48 µmol K^+/mg TG ($\alpha < 0{,}002$ MWU Test). Die Werte während der Senkungsbewegung sind mit im Mittel 0,46 µmol K^+/mg TG nicht signifikant verschieden vom Nachtwert ($\alpha > 0{,}1$); der Wert für die Hebungsphase ist 0,40 µmol K^+/mg TG. Aus der mittleren Reaktionskonstanten k_w = 0,90 $\pm$ 0,11 min^{-1} wird eine Halbwertszeit für die K^+-Abgabe aus der Zellwand von 0,77 min (n = 22) bestimmt. Die mittlere Reaktionskonstante k_{sym} für die K^+-Abgabe aus dem Symplasten beträgt in diesen Versuchen 0,126 $\pm$ 0,013 min^{-1} und damit die Halbwertszeit 6,66 min (n = 24).

	Trockengewicht (mg)	c^o_{sym} (µM)	k_{sym} (min^{-1})	c^o_w (µM)	k_w (min^{-1})	Auswaschvolumen (µl/min)	Auswaschlösung	K^+-Gehalt der Zellwand ($\frac{\mu mol}{mg\ TG}$)	ϕ_{sym} ($\frac{\mu mol\ K^+}{mg\ TG \cdot min}$)
TAG-STELLUNG	0.37	30.29	0.12	52.90	0.85	1150	200 mM LiCl,50 mM NaCl	0.19	0.094
	0.31	37.56	0.217	124.09	1.865	1250	"	0.26	0.15
	0.40	50.27	0.112	153.15	1.92	1310	"	0.26	0.16
	0.33	32.69	0.13	142.73	1.89	1425	"	0.33	0.14
	0.28	26.11	0.31	84.98	1.63	1370	240 mM LiCl,50 mM NaCl	0.25	0.13
	0.46	11.30	0.099	27.85	0.82	1545	"	0.11	0.04
	0.25	21.61	0.17	29.21	1.04	1370	"	0.15	0.12
MITTE SENKUNG	0.22	22.57	0.26	55.46	1.09	1530	150 mM LiCl,50 mM NaCl	0.35	0.16
	0.24	4.89	0.091	37.19	0.37	1093	"	0.45	0.022
	0.34	11.02	0.13	81.42	0.598	1513	"	0.60	0.049
	0.37	4.99	0.061	49.65	0.337	1123	"	0.45	0.015
NACHT-STELLUNG	0.38	18.61	0.14	33.35	1.024	2150	"	0.18	0.10
	-	Plateau	-	-	-	-	"	-	-
	0.35	10.95	0.093	41.22	0.54	2230	"	0.49	0.070
	0.52	12.58	0.09	34.13	0.409	2350	"	0.38	0.057
	0.28	6.75	0.102	80.64	0.69	1150	"	0.46	0.028
	0.28	nicht aufzusplitten		-	-	-	"	-	-
	0.29	2.82	0.068	95.55	0.672	1307	"	0.64	0.013
	0.41	38.05	0.17	65.37	0.973	1220	"	0.20	0.11
	0.32	4.18	0.100	77.44	0.756	1321	"	0.42	0.017
	0.31	7.65	0.095	46.84	0.359	1266	"	0.53	0.031
	0.23	1.38	0.029	56.45	0.675	1343	"	0.49	0.008
	0.78	17.09	0.116	188.11	1.417	2803	230 mM LiCl,1 mM $CaCl_2$	0.48	0.061
	0.58	15.75	0.133	86.57	0.989	2750	"	0.41	0.075
MITTE HEBUNG	0.29	6.14	0.069	34.83	-0.427	1393	150 mM LiCl,50 mM NaCl	0.39	0.029
	0.26	7.17	0.129	81.68	-0.58	1302	"	0.41	0.036

Tab. 10 Errechneter K^+-Gehalt der Extensorzellwand und K^+-Fluß ϕ_{sym} über das Plasmalemma von sofort nach dem Schneiden mit isotonischer Salzlösung ausgewaschenen Tangentialschnitten aus verschiedenen Blattpositionen; Versuchsparameter wie in Tab. 9.

Phasenlage	K^+- Gehalt der Extensorzellwand ($\frac{\mu mol}{mg\ TG} \pm SF$)	verwendete Auswaschlösung für die frischen Schnitte
Tagstellung (14 - 20 h)	0.22±0.03 n=7	200 mM LiCl, 50 mM NaCl bzw. 240 mM LiCl, 50 mM NaCl
Senkungsbewegung (23 - 24 h)	0.46±0.05 n=4	150 mM LiCl, 50 mM NaCl
Nachtstellung (0 h)	0.48±0.03 n=9	"
Hebungsbewegung (~5 h)	0.40±0.01 n=2	"

Tab. 11 In situ K^+-Gehalt der Extensorzellwand bei verschiedenen Blattpositionen
Signifikanzlevel α nach dem MWU Test: $\alpha < 0{,}002$, wenn K^+-Gehalte der Tagstellung und Nachtstellung verglichen werden; $\alpha > 0{,}1$, wenn Ergebnisse der Senkungsphase und Nachtphase verglichen werdn (nicht signifikant voneinander verschieden).

Auswaschversuche mit dem Ziel, andere Kationen als K^+ in der Zellwand auszutauschen:

Da während der Tagphase nur noch etwa die halbe K^+-Menge aus der Zellwand ausgewaschen wurde, lag es nahe zu versuchen, noch andere Kationen aus der Zellwand auszuwaschen. Je zwei Experimente mit 200 mM LiCl, 1 mM $CaCl_2$ (Tagstellung) bzw. mit 230 mM LiCl, 1 mM $CaCl_2$ (Nachtstellung) ergaben, daß in keiner der gestesteten Bewegungsphasen Na^+ in der Zellwand ist. Es fanden sich zwar Spuren von Na^+ in den ersten Eluaten (Na^+-Konzentration $\leq$ 2,5 µM für das erste 30 sec-Intervall), aber es ergab sich nicht andeutungsweise eine Na^+-Austauschkinetik. Vermutlich kommt dies Na^+ aus den angeschnittenen Zellen. Wenn zum zweiten Mal in einer K^+-Austauschkinetik die Differenz zwischen "Originaldaten" und der Zellwandregressionsgeraden gebildet wird (Abb. 4), ergibt sich für das erste 30 sec-Intervall, worin eben der Zellsaft der angeschnittenen Zellen enthalten ist, ein Verhältnis

Na^+ : K^+ von 1 - 2,7 % : 100 %. Weder in der Zellwand noch in der Vakuole scheint also in situ nennenswert Na^+ vorzukommen. Da die photometrische Na^+-Bestimmung sogar noch etwas empfindlicher ist als die von K^+, sind diese geringen Na^+-Mengen nicht auf einen experimentellen Fehler zurückzuführen.

Es war nicht zu erwarten, Ca^{2+} in der gleichen, einfachen Weise wie K^+ oder Na^+ in der Zellwand austauschen zu können. Denn 1. hätten andere Erdalkaliionen oder dreiwertige Kationen verwendet werden müssen, 2. hätten aber nur geringe Konzentrationen von zwei- oder dreiwertigen Kationen verwendet werden können ($\leq$ 10 mM $MgCl_2$, $\leq$ 3 mM $SrCl_2$, $LaCl_3$), damit die Membranfunktionen möglichst ungestört bleiben. Die Verunreinigung durch Ca^{2+} wäre akzeptabel gewesen (Tab. 1), aber die Austauschkinetik wäre vermutlich sehr langsam gewesen. 3. wurde eine tatsächliche Nachweisgrenze des AAS-Gerätes von > 10 µM Ca^{2+} gemessen (vom Hersteller angegeben 0,125 µM). Und 4. waren ja auch nur geringe Ca^{2+}-Konzentrationen in den Eluaten zu erwarten.

Der Ca^{2+}-Gehalt der Zellwand in den verschiedenen Bewegungsphasen wurde daher im Rahmen dieser Untersuchungen nicht bestimmt.

4.3.3. K^+-Gehalt der Zellwand nach 1,5 h Inkubation der Extensorschnitte

Die im folgenden beschriebenen Versuche (Inkubation frischer Schnitte in 10 mM KCl für 1,5 h) wurden angefangen in dem Wissen, daß die vorgegebene Inkubationslösung den Water Free Space der Zellwand füllen wird ($[K^+]_{Inkub.} = [K^+]_{WFS}$), und in der Hoffnung, Water Free Space und Donnan Free Space kinetisch auftrennen zu können und am Kompartiment Water Free Space die ganze Methode überprüfen zu können. Das ist nicht gelungen. Denn der K^+-Gehalt (µmol) der schnellsten, zu identifizierenden Komponente ist immer so groß, daß für den Water Free Space ein Volumen in der Größenordnung des gesamten Volumens des feuchten Schnittes (mg = µl) berechnet wird. Das ist unsinnig und bestärkte mich darin, daß

	Trocken-gewicht (mg)	C^{o}_{sym} (µM)	k_{sym} (min^{-1})	C^{o}_{w} (µM)	k_{w} (min^{-1})	Auswasch-volumen (µl/min)	Inkubations-lösung / Auswasch-lösung	K^+-Gehalt der Zellwand ($\frac{nmol\ K^+}{mg\ TG}$)	$\dot{V}_{sym}$ ($\frac{nmol\ K^+}{mg\ TG \cdot min}$)
Tag-stellung	0.81	12.94	0.096	48.81	0.588	2390	10 mM KCl / 5 mM RbCl, 5 mM NaCl	0.24	0.038
	0.49	10.86	0.126	87.38	0.772	1770		0.41	0.039
	0.50	6.48	0.107	76.86	0.72	1780		0.38	0.023
Nacht-stellung	0.55	11.8	0.097	57.40	0.837	2230	10 mM KCl / 5 mM RbCl, 5 mM NaCl	0.28	0.048
	0.64	11.25	0.044	52.70	0.57	1930		0.28	0.034
	0.63	12.83	0.108	65.37	0.93	1940		0.22	0.039
	0.50	13.07	0.11	41.68	0.847	2195	10 mM RbCl, 0.2 mM $CaCl_2$	0.22	0.057
	0.43	8.29	0.153	78.30	0.85	1680		0.36	0.032
Tag-stellung	0.36	-	-	52.31	0.628	1319	10 mM KCl, 10 mM Tris·HCl pH 8-9 / 5 mM LiCl, 5 mM NaCl, 10 mM TrisHCl pH 8-9	0.42	-
	0.17	-	-	55.18	0.84	1409		0.54	-
	0.24	-	-	38.36	0.78	1343		0.28	-
	0.25	-	-	58.17	1.117	1402		0.29	-
	0.29	-	-	112.25	0.681	1360		0.61	-
	0.15	-	-	62.12	0.811	1300		0.66	-
Nacht-stellung	0.49 <	7.19	0.286	96.45	1.476	1307	" / "	> 0.32	-
		-	-	47.19	0.91	1413			-
	0.24	-	-	48.90	0.90	1415		0.32	-
	0.19	-	-	53.27	0.723	1422		0.55	-
	0.16	-	-	65.97	0.837	1377		0.68	-
	0.27	-	-	60.27	0.94	1338		0.32	-
Tag-stellung	0.20	2.467	0.053	45.20	0.636	1280	10 mM KCl, 10 mM Tris, pH8-9 0.1 mM EGTA / 5 mM LiCl, 5 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8-9	0.45	0.016
	0.13	-	-	26.92	0.507	1347		0.55	-
	0.21	-	-	70.19	0.797	1347		0.56	-
	0.20	-	-	60.89	0.643	1367		0.65	-
Nacht-stellung	0.26	-	-	132.2	1.106	1080	10 mM KCl, 1 mM Tris, pH7.8 ~0.1 mM EGTA / 5 mM RbCl, 5 mM NaCl	0.50	-
	0.36	-	-	120.1	0.929	1190		0.42	-
	0.28	-	-	85.99	0.65	1160		0.55	-
	0.22	1.23	0.058	86.65	1.256	1306	10 mM KCl, 10 mM Tris, pH8-9 0.1 mM EGTA / 5 mM LiCl, 5 mM NaCl, 10 mM TrisHCl pH 8-9	0.41	0.0073
	0.13	-	-	33.06	0.62	1314		0.54	-
	0.25	-	-	77.42	0.87	1348		0.48	-
	0.13	-	-	36.62	0.74	1362		0.51	-

Tab. 12 K^+-Gehalte der Zellwand und K^+-Flüsse ϕ_{sym} über das Plasmalemma von Extensorschnitten, die 1,5 h lang wahlweise in die angegebenen Inkubationslösungen inkubiert waren und dann mit den aufgeführten Auswaschlösungen ausgewaschen wurden; Versuchsparameter wie in Tab. 9; die Symplastenkinetik fehlt oft unter diesen Versuchsbedingungen.

sowohl bei frischen Schnitten wie auch bei inkubierten Schnitten mit der schnellsten Komponente der Auswaschkinetik der Gesamtgehalt an K^+ im DFS und WFS erfaßt wird, wobei die anteilmäßige Verteilung nicht bestimmbar ist. K^+ wird aus dem WFS genauso langsam ausgewaschen wie aus dem DFS; denn die Diffusion im Schnitt ist limitierend.

In Tab. 12 sind die Ergebnisse aller Auswaschexperimente an inkubierten Schnitten mit den Versuchsparametern und dem daraus berechneten K^+-Gehalt pro mg Trockengewicht zusammengestellt (Beispiel einer Auswaschkinetik siehe Abb. 23 c). Die Versuche, bei denen Extensorschnitte in 10 mM KCl, 10 mM Trispuffer pH 8 - 9, 0,1 mM EGTA 1,5 h lang inkubiert wurden, um der Zellwand das Ca^{2+} zu entziehen, wurden durchgeführt, um einen eventuell erhöhten Ca^{2+}-Gehalt der Zellwand während der Tagphase (im Vergleich mit Kontrollversuchen ohne EGTA) herauszufinden. Für den Austausch am Plasmalemma erhält man hier die gemittelte Geschwindigkeitskonstante $k_{sym} = 0{,}112 \pm 0{,}02\ min^{-1}$; das entspricht einer Halbwertszeit von 6,19 min (n = 11). Aus der mittleren Geschwindigkeitskonstanten $k_w = 0{,}83 \pm 0{,}04\ min^{-1}$ errechnet sich eine Halbwertszeit von 0,83 min (n = 31).

In Tab. 13 sind die gemittelten K^+-Gehalte der Zellwand aufgelistet, geordnet nach der Zusammensetzung des Inkubationsmediums und den Bewegungsphasen, in denen die Schnitte aus den Blattgelenken geschnitten wurden. Wenn die Schnitte in 10 mM KCl gelegt wurden, ergaben die Auswaschexperimente im Durchschnitt K^+-Gehalte in der Zellwand von 0,34 µmol K^+/mg TG bei Schnitten aus der Tagstellung und bei Schnitten aus der Nachtstellung von 0,26 µmol K^+/mg TG. Der Unterschied ist nicht signifikant; die Wahrscheinlichkeit p nach dem MWU Test ist 0,14. Wurden die Schnitte inkubiert in 10 mM KCl und 10 mM Tripuffer, eingestellt mit HCl auf pH 8 - 9, enthielt die Zellwand eine größere Menge an K^+, nämlich 0,47 µmol K^+/mg TG bzw. 0,44 µmol K^+/mg TG im Durchschnitt für die zwei verschiedenen Bewegungsphasen (p = 0,79). War noch zusätzlich 0,1 mM EGTA in der Inkubationslösung, sind die beiden Mittelwerte noch etwas größer, nämlich

0,55 µmol K^+/mg TG für Extensorschnitte aus der Tagstellung und 0,49 µmol K^+/mg TG für Schnitte aus der Nachtstellung der Blätter (p = 0,65). Es fällt auf, daß in jeder Gruppe jeweils Tag- und Nachtwert zwar gleichsinnig etwas unterschiedlich sind, daß die Unterschiede aber statistisch betrachtet nicht als signifikant zu werten sind. Durch die Inkubation werden anscheinend in der Zellwand, gemeint ist Donnan Free Space plus Water Free Space, etwa gleiche Kationengehalte induziert und infolgedessen die in situ Unterschiede im Tagesgang zerstört. Die Mittelwerte der Gruppen III + IV und V + VI sind statistisch betrachtet gleich (Signifikanzlevel $\alpha > 0,1$); EGTA macht also unbedeutend wenig negative Festladungen durch das Herauslösen und Komplexieren von Ca^{2+} für K^+ frei. Der Unterschied im K^+-Gehalt zwischen den Gruppen I + II und III + VI ist signifikant ($\alpha = 0,02$).

	K^+-Gehalt der Zellwand (µmol · mg^{-1} TG)	
	Tag	Nacht
I: 10 mM KCl, ungepuffert pH ~6 A: 5 mM RbCl, 5 mM NaCl	0.34 ± 0.05 n=3 I	0.26 ± 0.03 n=5 II
I: 10 mM KCl, 10 mM Tris·HCl, pH 8-9 A: 5 mM LiCl, 5 mM NaCl 10 mM Tris·HCl, pH 8-9	0.47 ± 0.07 n=6 III	0.44 ± 0.07 n=5 IV
I: 10 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 10 mM Tris·HCl, pH 8-9 A: 5 mM LiCl, 5 mM NaCl, 10 mM Tris·HCl, pH 8-9	0.55 ± 0.04 n=4 V	0.49 ± 0.02 n=7 VI

Tab. 13 K^+-Gehalt (Mittelwert ± SF) von 1,5 h lang inkubierten Schnitten, die aus der Tagphase bzw. Nachtphase der schwingenden Blätter stammten
I: Inkubationslösung A: Auswaschlösung
I - VI Bezeichnung für die aufgeführten Versuchsgruppen bzw. deren Ergebnisse

I und II	nicht signifikant verschieden	(p = 0,14)
III und IV	"	(p = 0,79)
V und VI	"	(p = 0,65)
III+IV und V+VI	"	($\alpha > 0,10$)
I+II und III+IV	signifikant verschieden	($\alpha = 0,02$)

An dieser Stelle sei kurz diskutiert, inwiefern der Startzeitpunkt der Stoppuhr, bei dem/nachdem die zwei oder drei Schnitte in die bereits durchströmte Küvette gelegt worden sind, eine Rolle spielt für die zu errechnende K^+-Menge in der Zellwand. Aus Tab. 14 geht klar hervor, daß eine Verzögerung beim Starten der Stoppuhr um 10 sec eine Änderung der ausgewaschenen K^+-Menge, bezogen aufs Trockengewicht, um 0,026 µmol K^+/mg TG ausmachen würde; das entspricht einem Fehler von 10 %. Wenn Fehler gemacht wurden, so waren diese sicher nicht eine Verzögerung um 10 sec oder gar ein zu frühes Starten, sondern waren unbedeutender. Solche Fehler, wozu auch die Durchlaufzeit der Auswaschlösung durch die Küvette (schätzungsweise 2 sec) beitragen würde, können also vernachlässigt werden bei der gegebenen Streuung der Meßwerte. Dasselbe gilt für die Symplastenkinetik.

Zeitpunkte, wann die Uhr hätte auch gestartet werden können absolut (min)	relativ	ln C_w^o	K^+-Gehalt der Zellwand ($\frac{\mu mol}{mg\ TG}$)	prozentuale Veränderung des K^+-Gehalts
0.167	10 sec später	3.8686	0.2510	90.8 %
0.083	5 "	3.9168	0.2634	95.3 %
0.033	2 "	3.9455	0.2711	98.1 %
Zeitpunkt 0 in einem durchgeführten Experiment		3.9647	0.2763	100.0 %
-0.033	2 sec früher	3.9838	0.2817	101.9 %
-0.083	5 "	4.0126	0.2899	104.9 %
-0.167	10 "	4.0605	0.3041	110.1 %

Tab. 14 Abhängigkeit des K^+-Gehaltes der Zellwand vom Zeitpunkt, wann das Auswaschexperiment auf der Stoppuhr gestartet wird.
Experiment an einem 1,5 h lang in 10 mM KCL inkubierten Schnitt: ln C_w^o Schnittpunkt der Regressionsgeraden der Zellwandkinetik mit der y-Achse; k_w = 0,575 min^{-1}; Auswaschvolumen 1930 µl/min; TG = 0,64 mg.

4.3.4. K^+-Flüsse über das Plasmalemma nach außen

In Tab. 15 sind die Mittelwerte der berechneten K^+-Flüsse $\overset{I}{\Phi}_{sym}$ aus dem Symplasten, bezogen aufs Trockengewicht, der vorher beschriebenen Auswaschversuche zusammengestellt. Ein Vergleich der Ergebnisse zeigt Folgendes: Wenn frische Extensortangentialschnitte in hypotonischer Salzlösung ausgewaschen wurden, sind die K^+-Flüsse aus dem Symplasten gleich groß für Tag- und Nachtstellung. Sie sind die größten Werte, die überhaupt auftreten. Schnitte, die mit annähernd isotonischer Lösung ausgewaschen wurden, zeigen einen großen K^+-Fluß, wenn sie aus Gelenken der Tagstellung angefertigt wurden, aber einen viel kleineren Fluß, wenn sie aus Gelenken der Nachtstellung präpariert wurden. Für Schnitte aus der Senkungsbewegung ist der K^+-Fluß aus dem Symplasten auch klein. Er gleicht dem Mittelwert der Nachtstellung. Wenn dem gesamten Blatt über den Transpirationsstrom ca. einen Tag lang eine 10 mM KCl-Lösung angeboten wurde und wenn anschließend die Schnitte mit hypotonischer Lösung ausgewaschen wurden, sind die Flüsse bezüglich Bewegungsphase offenbar gleich groß, aber um ungefähr die Hälfte kleiner als bei nicht inkubiertem, frisch präpariertem Gewebe (Kontrolle), das mit hypotonischen Lösungen ausgewaschen wurde. Wenn Schnitte 1,5 h lang in ungepufferter 10 mM KCl-Lösung inkubiert lagen, sind die K^+-Flüsse schon deutlich reduziert, verglichen mit frisch gefertigten Schnitten. Unterschiede zwischen Tag und Nacht sind nicht mehr erkennbar. Wenn Schnitte in gepufferten Lösungen bei pH 8 - 9 lagen, zeigt sich schon an den Kinetiken, daß aus dem Symplasten meistens keine meßbaren Mengen an K^+ mehr herauskamen (Abb. 23 c, Tab. 12). Wenn aus diesen Kinetiken Flüsse zu berechnen sind, ergeben sich sehr geringe Werte. Vielleicht rührt das letztgenannte Ergebnis daher, daß Li^+ schlechter als Rb^+ übers Plasmalemma im Austausch gegen K^+ aufgenommen wird.

Diese Ergebnisse zusammen zeigen, daß die gewählten Versuchs- und Auswaschbedingungen einen großen Einfluß nehmen auf die zu beobachtenden K^+-Flüsse übers Plasmalemma.

Versuchsbedingungen	K^+-Fluß ϕ_{sym} ($\mu mol \cdot mg^{-1}TG \cdot min^{-1}$) Tag	Nacht	Mitte Senkung
frische Schnitte, mit hypotonischer Salzlösung ausgewaschen (5 mM RbCl, 5 mM NaCl)	0.12 ± 0.03 n = 4	0.15 ± 0.02 n = 3	
frische Schnitte, mit Salzlösungen hoher Osmolarität ausgewaschen (50 mM NaCl, 150-240 mM LiCl)	0.13 ± 0.01 n = 6	0.052 ± 0.01 n = 11	0.061 ± 0.03 n = 4
Inkubation in 10 mM KCl via Transpiration; frische Schnitte ausgewaschen(5mM RbCl,5mM NaCl)	0.069 ± 0.01 n = 3	0.062 n = 1	
1.5 h lang inkubierte Schnitte (10 mM KCl, pH 5-6), ausgewaschen mit 5 mM RbCl,5 mM NaCl	0.039 ± 0.004 n = 8		
1.5 h lang inkubierte Schnitte (10 mM KCl,10 mM Tris,pH 8-9), ausgewaschen mit 10 mM Tris, pH 8-9, 5 mM LiCl, 5 mM NaCl	0.012 n = 2		

Tab. 15 K^+-Flüsse (Mittelwerte ± SF) aus dem Symplasten von Extensortangentialschnitten, bezogen aufs Trockengewicht der Schnitte, bei verschiedenen osmotischen Gradienten und Inkubationsbedingungen

4.4. Zellwandvolumen nach der ^{14}C-Inulin-Methode

Auch ^{14}C-Inulin wurde 18 - 26 h lang via Transpirationsstrom den Blattgelenken angeboten. Eine Aufnahmekinetik wurde experimentell nicht ermittelt - weder für die radioaktive Aufladung über den Transpirationsstrom noch für Schnitte, die in Inulinlösungen inkubiert worden wären -, da bekannt war, daß bereits nach 2 h im Transpirationsstrom angebotenes $^{36}Cl^-$ in Extensor- und Flexorschnitten nachzuweisen ist, und weil angenommen wurde, daß nach 18 h Inkubation die Extensor- und Flexorzellwände "durchgeladen" sind, weil die Zeitkonstanten τ_1 der Auswaschkinetiken von $^{86}Rb^+$ und $^{36}Cl^-$

z. B. sehr kurz sind (Rb^+-Efflux 1,32 min, Cl^--Efflux 0,90 min). Auch wurden keine Auswaschversuche gemacht, deren einphasige Kinetik das Auswaschen von Inulin nur aus dem Zellwandkompartiment bewiesen hätte. Übereinstimmend mit der Literatur (ZIMMERMAN, PILWAT 1971; ROTTENBERG et al. 1972) wurde angenommen, daß Inulin nicht durch Membranen geht, sondern im Free Space bleibt.

In Tab. 16 sind Versuchsbedingungen und Ergebnisse zur Volumenbestimmung des Apoplasten mit ^{14}C-Inulin zusammengestellt. Die geringe, in den Schnitten enthaltene ^{14}C-Aktivität (1. Zeile bei Ergebnisse) deutet an, daß die eingesetzte ^{14}C-Aktivität (Versuchsbedingungen) hätte größer sein sollen. Bei einem durchschnittlichen Gewicht des Gewebewassers (Frischgewicht minus Trockengewicht) von ungefähr 2,80 mg pro Schnitt lag die Aktivität nur ca. dreimal über dem 0-Wert der Szintillationsproben. Obwohl die Inkubationszeiten verschieden waren und die Schnitte unterschiedlich aufgearbeitet wurden, nämlich entweder zerrieben und in wäßriger Lösung extrahiert oder im Sauerstoffstrom zu $^{14}CO_2$ verbrannt wurden, ergeben sich durch Rechnung aus der in den Schnitten enthaltenen Aktivität und der eingesetzten Aktivität Apoplastenvolumina (in Prozenten vom Volumen des Gewebewassers), die gut übereinstimmen: beim Extensor 2,25 % für Schnitte aus der Tagstellung und 3,72 % für solche aus der Nachtstellung, beim Flexor 3,03 % bei Tagstellung und 2,30 % bei Nachtstellung. Wenn das Apoplastenvolumen wie soeben auf das Gewebewasser der Schnitte bezogen wird, sind in dem Ausdruck noch die Volumenschwankungen vor allem der Extensorzellen zwischen Tag und Nacht enthalten. Das Zellwandvolumen, bezogen auf das Naßvolumen der Zellen, muß im Extensorgewebe nachts größer sein.

Um Änderungen des Zellvolumens im Tagesgang zu eliminieren, wurde ebenso das Apoplastenvolumen AV pro mg Trockengewicht ermittelt (unterste Zeile in der Tabelle). Für den Extensor sind die beiden Werte, 0,23 µl AV/mg TG für die Tagstellung und 0,32 µl AV/mg TG für die Nachtstellung, nicht signifikant verschieden ($p = 0,14$, MWU Test). Genausowenig sind es die beiden Flexorwerte 0,32 µl AV/mg TG und 0,28 µl AV/mg TG

($p = 0,70$). Die Änderung des prozentualen Anteils der Zellwand am Gesamtgewebe (Zellwand plus Symplast) im Extensor von 2,25 % auf 3,72 % würde einer 40%igen Verringerung des Symplastenvolumens entsprechen. Im Flexor würde die Änderung von 2,30 % auf 3,03 % einer Volumenverminderung um 24 % während der Tagstellung des Gelenks entsprechen. Das stimmt gut mit den 30 % Volumenänderung überein, die in einer früheren Veröffentlichung angenommen wurden (FREUDLING et al. 1980).

VERSUCHSBEDINGUNGEN		späte Tagstellung 14 - 20 h	Nachtstellung 0 h
eingesetzte Inulin-^{14}C-Carbonsäureaktivität		2 µCi in 4 ml $\frac{1}{10}$ S_1	2 µCi in 3 ml $\frac{1}{10}$ S_1
eingesetzte Aktivität		1078 dpm/µl	1429 dpm/µl
resultierende Inulinkonzentration		35 µM	46.7 µM
Inkubationszeit		25 - 26 h	18 - 19 h
Aufarbeitung der Schnitte nach dem Trocknen		mit Quarzsand zermörsert; Extraktion in $\frac{1}{10}$ S_1	im Sauerstoffstrom zu $^{14}CO_2$ verbrannt; $^{14}CO_2$ absorbiert
ERGEBNISSE			
in den Schnitten enthaltene ^{14}C-Aktivität (dpm/mg Gewebewasser)	Ex	24.3 ± 6.9 n = 4	53.1 ± 1.2 n = 3
	Flex	32.7 ± 15.4 n = 3	32.9 ± 6.9 n = 3
Trockengewicht/Frischgewicht (%)	Ex	9.0	10.9
	Flex	8.8	7.6
Apoplastenvolumen, bezogen auf Gewebewasser (Volumenprozente; mg = µl)	Ex	2.25	3.72
	Flex	3.03	2.30
Apoplastenvolumen, bezogen aufs Trockengewicht (µl/mg TG)	Ex	0.23 ± 0.05	0.32 ± 0.04
	Flex	0.32 ± 0.08	0.28 ± 0.06

Tab. 16 In situ Markierung von Blattgelenksgewebe mit ^{14}C-Inulin via Transpirationsstrom: Versuchsbedingungen und Ergebnisse; Trockengewicht TG der markierten Schnitte, ausgedrückt in Prozenten vom Frischgewicht FG der Schnitte, das 100 % gesetzt wird.

5. Diskussion

5.1. Elektrische Experimente

5.1.1. Es ist problematisch, an herausgeschnittenem Blattgelenksgewebe Potentialmessungen zu machen in der Absicht, in situ Verhältnisse zu erfassen!

Weil ich selber auf Grund der vorhandenen Literatur irregeleitet worden bin, möchte ich gleich zu Beginn der Diskussion einen sehr wichtigen und kritischen Punkt bezüglich elektrischer Experimente an "isolierten Blattgelenksgewebeschnitten" von tagesperiodisch schwingenden Blättern ansprechen: frisch gefertigte Radialschnitte aus dem Bohnenblattgelenk zeigen ein anderes elektrisches Verhalten bei elektrophysiologischen Untersuchungen als 24 h lang in der gleichen Badelösung gealterte Schnitte (5.1.2.). Die offene Antwort auf die Frage drängt, ob die an isolierten Schnitten gewonnenen elektrischen Meßergebnisse wirklich die elektrischen Potentialverhältnisse in situ im Blattgelenk widerspiegeln (5.1.3.). Sobald Gelenke oder gar nur Teile/Schnitte vom Gelenk von der intakten Pflanze isoliert und in eine Badelösung gelegt werden, werden die osmotischen Verhältnisse des Gewebes geändert, die in situ Verhältnisse in der Zellwand gestört und dort neue Ionenverhältnisse induziert (4.3.3.), und infolgedessen wird wahrscheinlich auch der Transport übers Plasmalemma betroffen sein. Das Gewebe ist verwundet und fängt mit Wundheilung bzw. Alterung in dem neuen Bademedium an (ZIMMERMANN, KAHL 1982; VAN STEVENINCK 1975). Als erste, schnelle Wundreaktionen werden in dieser Literatur genannt, daß die Membranpermeabilität schlagartig erhöht wird, daß der Zitronensäurezyklus drastisch aktiviert wird und der Anteil der cyanidresistenten Atmung immer mehr zunimmt. Elektrophysiologen schreiben so: "Potentialmessungen an herausgeschnittenen, vielzelligen Geweben und Organen müssen mit großer Vorsicht betrachtet werden. Die Analyse von Ergebnissen über Membranpotentiale und Ionenaufnahme unter Nichtgleichgewichtsbedingungen wird sicherlich viel komplexer sein als ursprünglich angenommen" (MERTZ, HIGINBOTHAM 1976). Es kann also

nicht selbstverständlich erwartet werden, daß die durch Potentialmessungen an frischen Schnitten gewonnenen elektrischen Daten die in situ Verhältnisse der Membranen und Kompartimente widergeben (5.1.4.).

In Veröffentlichungen über elektrische Potentialmessungen an herausgeschnittenen Blattgelenken wird dieses Probelm nur am Rande erwähnt, um niedrige Membranpotentiale in 1 mM K^+-Außenlösung zu erklären (RACUSEN, SATTER 1975), bzw. einfach ignoriert (SCOTT et al. 1977; RACUSEN, GALSTON 1977).

Wir konnten in der ersten Arbeit über circadiane Unterschiede bei Potentialmessungen an Extensorzellen auch zunächst nicht klären, ob die Ergebnisse an frischen Schnitten oder die an gealterten Schnitten die in situ Eigenschaften von Extensorzellen besser widerspiegeln (FREUDLING et al. 1980). Eine darüber weitergehende Diskussion ist notwendig und möglich geworden, weil elektrische Messungen inzwischen an frisch gefertigten Schnitten im Tagesgang, an 24 h lang in einer Badelösung gealterten Schnitten und in intakten Gelenken in situ (STARRACH et al. in press) durchgeführt worden sind und das Ergebnis sehr unterschiedlich ist. Das Membranpotential von frischen Schnitten in S_1 schwingt im Tagesgang zwischen -35 mV und -44 mV, es ist durch CN^- um 5 mV bis 13 mV (Durchschnittswerte während der Tagstellung bzw. während der Nachtstellung) zu depolarisieren, und die Hyperpolarisierung von E_m durch eine 10fach geringere K^+-Konzentration im Bademedium beträgt 20 mV bis 28 mV (Abb. 24, Tab Tab. 17). Wenn jedoch die Schnitte etwa einen Tag lang in S_1 in Dauerlicht inkubiert lagen, weisen die Extensorzellen viel negativere Membranpotentiale auf, nämlich zwischen -84 mV und -164 mV (Tab. 2, Tab. 17). Die elektrogene Komponente am Membranpotential ist von durchschnittlich 13 mV (elektrogene Komponente bei frischen Schnitten während der Nachtstellung) auf durchschnittlich 92 mV angestiegen. Das passive Diffusionspotential ist aber so niedrig geblieben wie bei frisch geschnittenen Extensorzellen. Das in Tab. 3 belegte Beispiel, wo an einem einzelnen Schnitt zu verschiedenen Zeiten des Alterns in S_1 Potentialableitungen an Extensorzellen gemacht wurden, läßt vermuten, daß das Zunehmen

der elektrogenen Komponente am Potential nach ca. 7 h abgeschlossen ist und daß ab diesem Zeitpunkt das Potential konstant bleibt. Auf eine Veränderung der K^+-Außenkonzentration reagiert das Potential von gealterten Extensorzellen im Schnitt nur noch mit 9,4 mV. Ausführliche Messungen zum zeitlichen Verlauf des Alterns von Schnitten aus dem Bohnenblattgelenk wurden nicht gemacht.

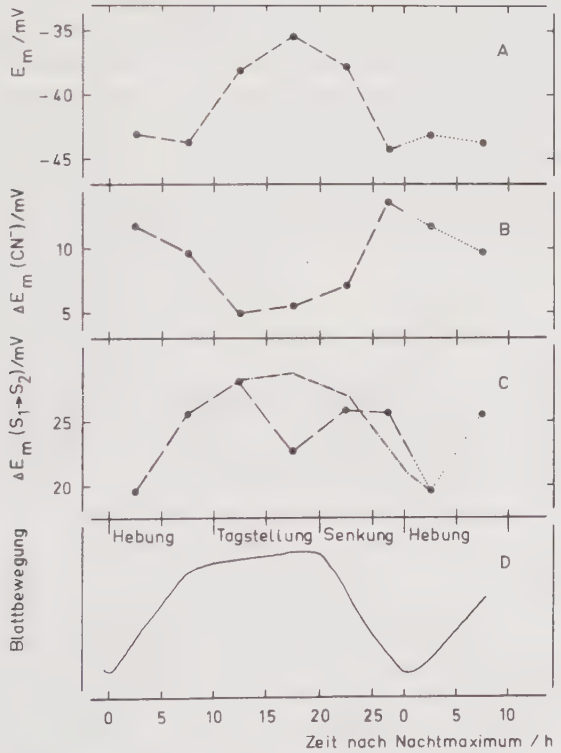

Abb. 24 Potentialmessungen (Mittelwerte) in Extensorzellen jeweils frischer Schnitte aus dem Laminargelenk von Phaseolus in verschiedenen Bewegungsphasen
A: das Ruhepotential E_m in S_1 (Abb. 8);
B: die jeweilige Depolarisation des Ruhepotentials durch CN^- (Abb. 9);
C: die duch eine 10fache Reduzierung der K^+-Konzentration auszulösenden Hyperpolarisierungen (Abb. 11, Spannungsbereich - 30 mV bis -50 mv);
D: ein typischer Verlauf der circadianen Blattbewegung

	frische Schnitte	in S_1 gealterte Schnitte
mittleres Ruhepotential in S_1	zwischen - 35 mV und - 44 mV	- 133 mV ± 4.0 n = 20
ΔE_m ($S_1 \rightarrow S_2$)	20 mV bis 28 mV	9.4 mV ± 0.64 n = 15
ΔE_m (Inhibitoren)	5 mV bis 13 mV	92 mV ± 4.9 n = 10
ΔE_m (Licht-aus / Licht-an)	nur vereinzelt geringe Potentialänderungen; Versuche aufgehört	starke Oszillationen von E_m werden ausgelöst
ΔE_m (pH-Änderungen in der Badelösung)	nicht untersucht	Hyperpolarisation bei Verringerung, Depolarisation bei Erhöhung der Protonenkonzentration

Tab. 17 Zum Vergleich zusammengestellte Ergebnisse elektrischer Membranpotentialmessungen in Extensorzellen von frischen und von 24 h lang gealterten Schnitten aus sekundären Bohnenblattgelenken bei verschiedenen experimentellen Bedingungen

Daß das Membranpotential von frisch angefertigten Schnitten und von solchen, die in einer Lösung stundenlang inkubiert lagen, sich stark unterscheidet, ist kaum überraschend und in der Literatur seit über zehn Jahren als Alterungseffekt beschrieben (MACKLON, HIGINBOTHAM 1968), ohne zunächst zu entscheiden, ob es sich hierbei um einen Artefakt oder eine Regeneration zurück zu in situ Verhältnissen handelt. Da steigt bei herausgeschnittenen und in 3,2 mM bzw. 32 mM Salzlösung inkubierten Epicotylsegmenten von der Erbse das Membranpotential der Zellen im Laufe von 48 h ohne anfängliche Lagphase auf circa den doppelten, negativen Wert. Das Membranpotential von Cortexzellen in 1 cm langen, abgeschnit-

tenen Wurzelstücken der Gerste steigt ohne Verzögerung im Laufe von 6 h in 0,5 mM $CaSO_4$-Lösung von -80 mV auf -200 mV an (PITMAN et al. 1970). Hier wird zum erstenmal darauf hingewiesen, daß das Membranpotential möglicherweise durch eine elektrogene Ionenpumpe auf diesen hohen Potentialbetrag gebracht wird. Und tatsächlich wird von LIN und HANSON (1974) nachgewiesen, daß die Inhibitoren FCCP und KCN das während 4 h Waschen immer negativer werdende Potential von Zellen in Wurzelstücken von Mais auf ein Diffusionspotential depolarisieren können, das sich nicht signifikant vom Ausgangspotential direkt nach dem Schneiden unterscheidet. Damit war also gezeigt, daß die Zunahme im Potential ausschließlich von der Aktivität einer elektrogenen Punpe herrührt, weil das Diffusionspotential sich durch das mehrstündige Inkubieren (bzw. Altern bzw. Waschen bzw. Wundheilung; die Benennung des Effekts ist noch vielfältig) nicht ändert. Nach 4 - 6 h scheint bei den Wurzelstücken der Potentialanstieg abgeschlossen.

5.1.2. Gleichgewichtspotentiale bei frischen Schnitten und Membranleitfähigkeitsänderungen während des Alterns von Schnitten

Im folgenden werden die elektrischen Verhältnisse im Extensorgewebe direkt nach dem Anfertigen der Schnitte und während des anschließenden Alterungsprozesses ausführlich beschrieben. In Tab. 18 oben sind die nächstfolgenden Ausführungen zusammengestellt.

Für die Abschätzung der Gleichgewichtspotentiale bei frischen Schnitten werden im Cytoplasma circa 150 mM KCl und 1 mM NaCl angenommen. Auf der Zellwandseite (außen) "sieht" das Plasmalemma nicht die Badelösung S_1 direkt, sondern die komplexen Ionenverhältnisse in der Zellwand. Diese bestehen darin, daß pflanzliche Zellwände eine hohe Konzentration an negativen Festladungen besitzen, die durch Kationen kompensiert/abgesättigt ist (Donnan Free Space, Abschnitt 2.2). Gleichzeitig werden in geringerer Menge noch Anionen und gleich viel Kationen aus dem Bademedium in die Zellwand auf-

genommen/adsorbiert, weil die Zellwand Anionen doch nicht vollends ausschließt (DEMARTY et al. 1980; HELFERICH 1959; Water Free Space nach DAINTY, HOPE 1959). Das größte, mittlere Zellwandpotential von -50 mV bei frischen Schnitten (Abb. 13) ergibt nach Nernst bei einer Konzentration von 100 mM einwertigen Kationen im Bademedium (10 mM KCl und 90 mM NaCl; 1 mM $CaCl_2$ wird bei dieser Überlegung vernachlässigt) eine Aktivität von 704 mM einwertigen Kationen in der Zellwand, die entsprechend mindestens 704 mM negative Festladungen absättigen. Mindestens muß es deswegen heißen, weil die Konzentration an Kationen und fixierten Anionen grösser sein kann. Die zusätzlich adsorbierte Menge an Elektrolyt in der Zellwand wird viel kleiner sein als 100 mM (S_1), schätzungsweise 30 - 40 mM K/NaCl (RITCHIE, LARKUM 1982). Mit diesen Konzentrationsangaben lassen sich wieder nach Nernst die einzelnen Gleichgewichtspotentiale E_{cw} in S_1 zwischen Cytoplasma und Zellwand abschätzen: E_{Na^+} = +166 mV, E_{K^+} = -18 mV, E_{Cl^-} = +33 mV. Zum Vergleich gibt es direkte Potentialmessungen an frischen Schnitten: Zellwandpotentiale E_w zwischen -37 mV und -50 mV und Membranpotentiale E_m (wahrscheinlich zwischen Vakuole und Badelösung gemessen) zwischen -35 mV und -44 mV (Abb. 13); letztere werden jedoch durch CN^--Einwirkung (Abb. 9) auf circa -30 mV für Tag- und Nachtstellung reduziert. Zwischen innen und Zellwand werden demzufolge positive Diffusionspotentiale von +7 mV bzw. +20 mV berechnet ($E_{diff} = E_m(CN^-) - E_w$). Die Tendenz hin zu einem positiven Diffusionspotential erahnt man schon auf Grund der abgeschätzten Gleichgewichtspotentiale in Tab. 18. Vermutlich liegt die Ruhespannung von frisch gefertigten Schnitten nicht genau beim K^+-Gleichgewichtspotential, sondern in Richtung E_{Cl^-} und E_{Na^+}. Die Verschiebung des Membranpotentials um nur maximal 32 mV, und nicht um 59 mV, wie es für ein reines K^+-Diffusionspotential zu erwarten wäre, deuten darauf hin. Daß die Potentialdifferenz zwischen innen und Zellwand positiv ist, ist überraschend und ungewöhnlich. Da aber die intrazelluläre Elektrode vermutlich im Vakuolenkompartiment steckt, muß berücksichtigt werden, daß die Vakuole meist positiv ist gegenüber dem Cytoplasma (BATES et al. (1982) bestimmen bei

Avena-Koleoptilen einen Unterschied von +40 mV zwischen Vakuole und Cytoplasma). Zudem kann mit Sicherheit angenommen werden, daß in situ elektrogene Ionenpumpen das Potential zwischen Cytoplasma und Zellwand negativieren.

frische Schnitte in der Bacelösung S_1							
außen		Zellwand			Plasma-lemma	innen	Gleichgewichts-potential Δ_{cw} des Ions i
$[c_i]$/mM	S_1 (S_2)	DPS	adsorbierte Ionen (nFS)	gesamt			
Na^+	90 (99)	634 (697)	36 (40)	670 (737)	← →	1	+166 mV
K^+	10 (1)	70 (7)	4 (0)	74 (7)	← →	150	-18 mV
Cl^-	100 (100)	0	40 (40)	40 (40)	← →	151	+33 mV
$-COO^-$	0	704 (704)	0	704 (704)	←	0	-
					← ATP, H^+, ADP		Δ_p -200 mV
Zellwandpotential E_w		-37 mV bis -50 mV					
Membranpotential E_m						-35 mV bis -44 mV	
Membranpotential unter CN^-						circa -30 mV	
Extensorgewebe in situ, Blätter in Tagstellung							
K^+		330	<40	<370	K^+ →	150	< +23 mV
Cl^-		0	<40	< 40	← Cl^-	150	> +33 mV
$-COO^-$		330	0	330	2 H^+/Cl^- →	0	-
-COOH		374	0	374		0	-
					← ATP, H^+, ADP		Δ_p -200 mV
Extensorgewebe in situ, Blätter in Nachtstellung							
K^+		704	>tags	>704	K^+ →	150	> +40 mV
Cl^-		0	>tags	>tags	← Cl^-	150	positiv
$-COO^-$		704	0	704	2 H^+/Cl^- ←	0	-
-COOH		0	0	0		0	-
					← ATP, H^+, ADP		Δ_p -200 mV

Tab. 18 Ionenkonzentrationen, elektrische Potentialdifferenzen und Transportsysteme im Extensor frisch gefertigter Schnitte und in situ (ausführliche Beschreibung im Text); die Zahlen in Klammern geben die Verhältnisse in der Badelösung S_2 an; die Vorzugsrichtung des passiven K^+ - und Cl^--Uniports, des passiven 2 H^+/Cl^--Cotransports und der ATP verbrauchenden H^+-Pumpe ist durch dickere Linien gekennzeichnet; die Konzentrationen von $[-COO^-]$ bzw. $[-COOH]$ in situ wurden auf Grund der Ergebnisse in Tab. 11 berechnet.

Das weitgehende Fehlen der elektrogenen Komponente beim Potential von Extensorzellen in frischen Schnitten (Tab. 17) kann zweierlei Ursachen haben: Entweder transportieren elektrogene Ionenpumpen im Extensorplasmalemma nicht mehr bzw. sehr wenig Ladungen, sind lahmgelegt durch die Schnittverletzung und Zerstörung der benachbarten Zellen und werden erst allmählich wieder regeneriert oder sie sind - alternativer Grenzfall - trotz der Wundsituation aktiv, und in den frischen Schnitten hat sich infolge des Herausschneidens aus dem intakten Gewebe nur das Verhältnis passive Leitfähigkeiten zu Pumpenleitfähigkeit zu Ungunsten der Pumpe drastisch verändert.

Beide Erklärungen lassen sich mit einem elektrischen Ersatzschaltbild der Plasmalemmamembran, das auch für Phaseolus angenommen werden kann, veranschaulichen (Abb. 25).

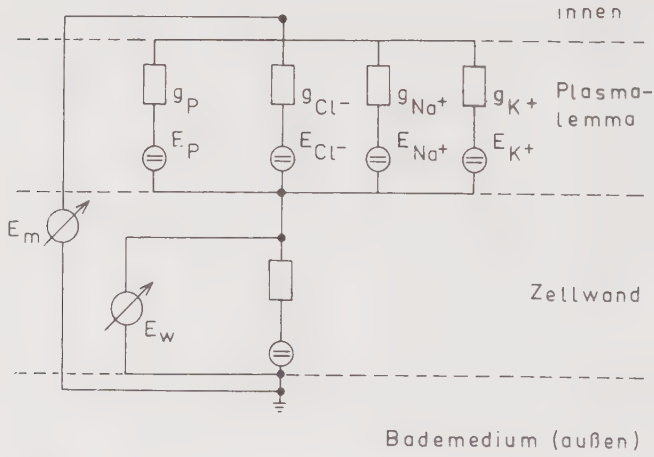

Abb. 25 Allgemeines elektrisches Ersatzschaltbild vom Plasmalemma mit Zellwand (Beschreibung im Text)

Bei gealterten und auch bei frischen Schnitten transportiert eine elektrogene Pumpe Ionen über das Plasmalemma (Depolarisierung von E_m durch CN^- + SHAM z. B., Tab. 2, Abb. 9). Der Transportweg der Pumpe ist im Ersatzschaltbild als E_p und g_p dargestellt. E_p, die elektromotorische Kraft der Pumpe, ist negativ; ob sie ungefähr -200 mV oder -400 mV beträgt, hängt von der Stöchiometrie der Pumpe ab (Transport von zwei Ladungen pro ATP oder von einer pro ATP, falls die Pumpe eine ATPase ist). g_p ist die Leitfähigkeit des Pumpenkanals, für die nach GRADMANN et al. (1982) allerdings Spannungsabhängigkeit zu erwarten ist. Parallel zu diesem aktiven Transportelement sind die verschiedenen passiven Diffusionssysteme von K^+, Na^+ und Cl^- geschaltet (Gleichgewichtspotentiale E_i und zugehörige Membranleitfähigkeiten g_i). Das aktuelle Ruhepotential wird davon bestimmt, wie groß die einzelnen Leitfähigkeiten g in Relation zu den anderen sind. E_m liegt nahe bei E_p, wenn g_p verglichen mit allen passiven Leitfähigkeiten sehr groß ist. E_m wird positiver, wenn g_p im Vergleich mit den anderen kleiner wird. Dominieren insgesamt die passiven Leitfähigkeiten, bestimmt darunter wiederum die größte Leitfähigkeit das aktuelle Ruhepotential (Goldmann-Gleichung). Weil das Membranpotential zwischen innen und Zellwand bei frischen Schnitten positiv ist - mit einem sehr geringen elektrogenen Anteil -, wird daraus geschlossen, daß die passiven Leifähigkeiten viel größer sind als g_p. Eine Beleg dafür sind die in diesem Fall großen Spannungsänderungen bei einer Erniedrigung der K^+-Außenkonzentration (Abb. 11) und eben die geringen durch CN^- ausgelösten Depolarisierungen (Abb. 9). Bei gealterten Schnitten hingegen muß die Leitfähigkeit der Pumpe sehr groß sein im Vergleich mit den passiven Leitfähigkeiten; denn E_m ist im Mittel um 92 mV negativer als E_{diff} (Tab. 17). Die geringe Potentialänderung gealterter Schnitte bei Reduzierung der K^+-Konzentration außen ($S_1 \rightarrow S_2$, Tab. 17) belegt, daß die K^+-Leitfähigkeit bei den gealterten Schnitten von untergeordneter Wichtigkeit ist. Diese Feststellung gilt, selbst wenn im Cytoplasma und in der Vakuole sich nach einem Tag Inkubation in S_1 höchstwahrscheinlich ein Na^+ : K^+-Ver-

hältnis von 9 : 1 eingestellt hat (5.2.1.3.).

Welche Leitfähigkeit nun, die der Pumpe (g_p) oder die passive Leitfähigkeit (alle zusammengefaßt), sich relativ zur anderen verändert im Verlauf des Alterungsprozesses, ob g_p zunimmt oder z. B. g_{K^+} fällt, kann aus den Potentialmessungen (ohne Widerstandsmessungen) nicht entschieden werden, insbesonders weil mit nicht-linearen, spannungsabhängigen Leitfähigkeiten zu rechnen ist (GRADMANN 1975; GRADMANN et al. 1982). Eine Entscheidung kann jedoch getroffen werden auf Grund der Ergebnisse der K^+-Auswaschversuche (Tab. 15). Da nämlich zeigen frisch gefertigte Schnitte, die sofort mit 10 mM Rb/NaCl ausgewaschen werden, große K^+-Flüsse aus dem Symplasten (ca. 0,14 µmol/mg TG·min). Nur 1,5 h lang gealterte Schnitte zeigen aber schon einen wesentlich geringeren K^+-Fluß (0,039 µmol/mg TG·min). Während des Alterns nimmt danach also die K^+-Leitfähigkeit wieder ab. Die Pumpenleitfähigkeit würde nach dieser Vorstellung durch das Schneiden und Altern unbeeinflußt bleiben (g_p = constant).

5.1.3. Elektrisches Verhalten gealterter Schnitte und deren Ähnlichkeit mit in situ Gewebe

Wirkung von Inhibitoren:

Die Inhibitoren NaCN, NaN_3, SHAM, NaCN + SHAM depolarisieren die Extensorzellmembran von gealterten Schnitten durchschnittlich um 92 mV; und diese Inhibitoren bringen das Potential auch zum Schwingen (Abb. 14). Die Mischung aus CN^- + SHAM in S_1 scheint am besten geeignet, E_m zu depolarisieren und bei E_{diff} zu halten. Eine Depolarisierung durch CN^- oder SHAM allein ist nur vorübergehend. Die Erklärung dafür kann sein, daß in verwundetem Gewebe die cyanid-resistente Atmung, ein Nebenweg der Atmungskette über die alternative Oxidase, stark zunimmt (ZIMMERMANN, KAHL 1982). Dieser Nebenweg ist durch SHAM blockierbar. Untersuchungen an Neurospora zeigen, daß verschiedene Inhibitoren das Membranpotential zum Schwingen bringen (GRADMANN, SLAYMAN 1975). Der Grund für die Schwingungen bei Neurospora wird darin gesehen, daß

der H^+-Strom der Protonenpumpe cyclisch moduliert wird wegen einer Rückkopplungsschleife im Energiestoffwechsel oder wegen eines Feedbackmechanismus zur Kontrolle des intrazellulären pH oder wegen beider Feedbacksysteme. Die Stabilisierung des cytoplasmatischen pH bei diesem System ist weiter untersucht worden (SANDERS et al. 1981) mit dem Ergebnis , daß die Protonenpumpe allein die Wiederherstellung des gestörten, cytoplasmatischen pH nicht zu leisten vermag, sondern daß tatsächlich und sinnvollerweise gleichzeitig ein passives Leck vergrößert wird, um bei der pH-Regulierung im Cytoplasma mitzuwirken. Erhöhte passive K^+, Na^+ und H^+-Flüsse werden aber experimentell ausgeschlossen. Für Phaseolus existieren diese detaillierten Untersuchungen nicht. Die durch N_3^-, CN^- und SHAM induzierten Potentialschwingungen in Extensorzellen gealterter Schnitte deuten möglicherweise aber auf denselben, komplexen Vorgang der pH-Regulierung im Cytoplasma hin. In diesem Zusammenhang sei eingefügt, daß durch CN^- ausgelöste Potentialänderungen bei frischen Schnitten auch manchmal in Oszillationen verlaufen (3. und 4. Registrierbeispiel in Abb. 7).

Wirkung von Licht-aus/Licht-an Reizen:

Dunkelpulse induzieren bei Nitella eine gedämpfte Schwingung des Membranpotentials (BOELS, HANSEN 1982). In ähnlicher Weise induzieren Licht-aus/Licht-an Pulse in den Extensorzellen von gealterten Schnitten aus dem Bohnenblattgelenk Oszillationen im Membranpotential (Abb. 17). Für Nitella gibt es schon klare Vorstellungen, wie alle beteiligten, chemischen Reaktionen, die den Lichteffekt zwischen Chloroplasten und Membranpotential vermitteln, miteinander arrangiert sein könnten (HANSEN 1974; MARTENS et al. 1979). Auch da muß offenbar der cytoplasmatische pH, der durch veränderte Protonenflüsse aus den Chloroplasten wegen den Licht-Dunkel-Reizen gestört wird, wieder einreguliert werden. Licht-aus/Licht-an Reize führen auch bei frischen Schnitten manchmal, wenn überhaupt eine Reaktion ausgelöst wird (4.1.1.4.), zu komplexen Spannungsantworten (Abb. 12).

Wirkungen von pH-Änderungen im Bademedium:

Bei gealterten Schnitten induzieren pH-Änderungen im Außenmedium - wenn auch sehr schwach - eine schwingende Potentialänderung (Abb. 15). Leider sind die Medien zu schnell gewechselt worden; die gedämpfte Schwingung konnte sich nicht voll manifestieren. Die ausgelösten Membranpotentialänderungen, d. h. die Abhängigkeit des Potentials vom pH der Badelösung (Abb. 16), zeigen, daß der H^+-Transport übers Plasmalemma getroffen wird. Bei höheren Pflanzenzellen kommen drei Transportsysteme für H^+ in Frage: der elektrogene, ATP verbrauchende H^+-Transport vom Cytoplasma nach außen (H^+-Pumpe), passive H^+-Diffusion von außen nach innen wegen des elektrochemischen Gradienten, passiver 2 H^+/Cl^--Cotransport in die gleiche Richtung auch wegen des elektrochemischen Gradienten. Damit allgemein eine elektrogene Pumpe und ein 2 H^+/Cl^--Cotransportsystem ökonomisch arbeiten, ist eine geringe passive H^+-Leitfähigkeit vorausgesetzt. Das bloße H^+-Diffusionssystem ist damit als Möglichkeit wohl ausgeschlossen. In Abb. 16 sieht man, daß die Kurve (Abhängigkeit des Membranpotentials gealterter Schnitte vom pH außen) sich der Geraden asymptotisch nähert, die das 2 H^+/Cl^--Cotransportsystem repräsentiert (die Bedeutung dieses "graphischen Näherungsverfahrens" ist bei FINGERLE, GRADMANN (1982) ausführlich beschrieben). Eine asymptotische Annäherung an die anderen zwei Geraden (eine steht für die elektrogene H^+-Pumpe mit E_p = -200 mV, die andere für die Diffusion von Protonen über die Membran) ist dem Augenschein nach unwahrscheinlich. Demzufolge trafen die pH-Änderungen im Bademedium weniger die Protonenpumpe, deren Untersuchung das experimentelle Ziel war, als vielmehr das 2 H^+/Cl^--Cotransportsystem, von dem in 5.1.4. und 5.3.3. die Rede sein wird. Kontrollexperimente, ob auch Änderungen des Membranpotentials durch pH-Änderungen im Bademedium ausgelöst werden auf Grund der passiven Membranleitfähigkeit (mit oder ohne Cosubstrat) bei "vergiftetem" Stoffwechsel, wurden nicht durchgeführt. Der angenommene pH_{innen} von 6,2 (ALLMENDINGER 1983) scheint zu stimmen; er wurde für den Zellsaft angeschnittener Extensorzellen bestimmt. Der Kurvenverlauf (geringe

Steigung bei niedrigem pH, größere Steigung bei hohem pH) kann nach FINGERLE, GRADMANN (1982) zudem dahingehend interpretiert werden, daß der vermutete H^+-Carrier, wenn er nicht mit H^+ beladen ist, neutral durchs Plasmalemma diffundiert, daß hingegen der protonierte Carrier positiv geladen ist und als komplexes Kation diffundiert.

Ähnlichkeit gealterter Schnitte mit in situ Gewebe:

Es ist nicht geklärt worden, ob die gealterten Schnitte in ihren elektrischen Eigenschaften noch circadian schwingen. Ihr elektrisches Verhalten bei Licht-aus/Licht-an Reizen zeigt aber eine deutliche Parallele zu Licht-aus/Licht-an Reaktionen von in situ abgeleiteten Extensorzellen, die neuerdings in intakten Blattgelenken aufgezeichnet wurden (STARRACH et al. in press). Da löst Licht-aus Hyperpolarisationen um 20 - 30 mV aus, wobei die Reaktionen als komplexe, gedämpfte Schwingung ähnlich der in Abb. 17 b verlaufen, und Licht-an löst Depolarisationen von 20 - 35 mV aus, die ebenfalls gedämpfte Schwingungen erkennen lassen. Weil die durch Licht-aus/Licht-an Reize ausgelösten Spannungsänderungen von in situ abgeleiteten Extensorzellen denen der gealterten Schnitte sehr ähnlich sind, werden zwei Schlüsse gezogen: 1. Eine Licht/Dunkel-Wirkung aufs Membranpotential kann nur gemessen werden, wenn die elektrogene Komponente im Membranpotenial stark ausgeprägt ist (Tab. 17). Bei frischen Schnitten kann folglich das Fehlen einer Spannungsantwort bei Licht-aus/Licht-an als zusammenhängend mit geringen CN^--Depolarisierungen verstanden werden. Genauso erklärt sich vermutlich auch, warum pH-Änderungen im Außenmedium bei Flexorzellen von frischen Schnitten keine signifikanten Potentialänderungen auslösen (GRADMANN, MAYER 1977). 2. Für in situ Extensorzellen kann eine beträchtliche elektrogene Komponente im Membranpotential vorausgesagt werden. Sie wird bei in situ Potentialmessungen leider nicht durch die gängigen Inhibitoren nachzuweisen sein. In der Literatur ist bereits bestätigt, daß unverletzte Gewebezellen ein negativeres Ruhepotential haben als frisch gefertigte Gewebeteile (MERTZ, HIGINBOTHAM 1976).

5.1.4. Elektrisches Verhalten frischer Schnitte

Als das niedrige Membranpotential von frisch gefertigten Schnitten verglichen wurde mit dem viel negativeren Ruhepotential von 24 h lang gealterten Schnitten, wurde als sinnvollste Erklärung angeboten, daß bei frischen Schnitten die passiven Leitfähigkeiten (für K^+ und vielleicht auch Cl^-) dominieren, daß hingegen in gealterten Schnitten die Pumpenleitfähigkeit (g_p) über die passiven Leitfähigkeiten dominiert. Wahrscheinlich wird durch die Schnittverletzung die passive Leitfähigkeit der den zerstörten Zellen nächstbenachbarten Zellen stark erhöht (VAN STEVENINCK 1975). Einerseits wird also festgestellt, daß die Ergebnisse an frischen Schnitten - die ausführlichsten Potentialmessungen sind gerade an diesen gemacht worden - wohl mehr darüber aussagen, welche elektrischen Verhältnisse durch die Schneideverletzung phasenabhängig induziert werden, als darüber wie die elektrischen Verhältnisse in situ im Extensorgewebe tatsächlich sind. Daß durch das Inkubieren in ein Bademedium zudem die signifikanten Unterschiede im K^+-Gehalt der Zellwand (Tab. 11) zerstört werden und stattdessen etwa gleiche Kationengehalte (Tab. 13) hergestellt werden, ist ebenso nachgewiesen. Andererseits weisen aber die circadiane Änderung des Zellwandpotentials (Abb. 13) und der komplizierte Tagesgang der Potentialantwort auf K^+-Änderungen im Bademedium (Abb. 11) darauf hin, daß die frischen Schnitte trotz der Verletzung und Störung noch in situ Verhältnisse widerspiegeln (siehe unten).

Bei frischen Schnitten wird gefunden, daß das Membranpotential in S_1 zunehmend weniger negativ wird, wenn in situ das Volumen der Extensorzellen zunimmt (Abb. 24 A), d.h. wenn das Blatt in Tagstellung übergeht. Andererseits wird das negativste Membranpotential dann gemessen, wenn das Blattgelenk in Nachtstellung ist, d.h. das Extensorzellvolumen minimal ist. Dieser Befund stimmt mit Messungen an anderen, nicht gealterten Gelenkstücken (Samanea und Trifolium) gut überein (RACUSEN, SATTER 1975; SCOTT et al. 1977). Das ist erstaunlich. Denn 1. wurden die abgeleiteten Potentiale auf zweierlei Weisen als Membranpotentiale identifiziert (einmal auf Grund einer zweiphasigen Spannungsantwort, wenn stufenförmig konstanter Strom in die Zelle injiziert wird; bei dieser Arbeit durch

Änderung der K^+-Konzentration in der Badelösung, was das registrierte Ruhepotential änderte) und 2. war die Ionenstärke des Phaseolus-Messmediums 25 bzw. 1000fach größer als bei den anderen Experimenten (Samanea: 1 mM KCl, 1 mM $Ca(NO_3)_2$, 0.25 mM $MgSO_4$, 1 mM Natriumphosphatpuffer; Trifolium: 0.1 mM KCl). Zudem wurde 3. eine sehr hohe Na^+-Konzentration verwendet (Na^+ : K^+ = 9 : 1; das ermöglicht bei gleichbleibender Ionenstärke eine 10fache Reduzierung der K^+-Konzentration bei relativ konstantem K^+ : Na^+-Verhältnis). Dieser 3. Punkt ist kritisiert worden (SATTER, GALSTON 1981), insofern daß Na^+ phasenverschiebend wirke und deswegen auch der Rhythmus vom Membranpotential verändert/verschoben würde. Dem steht allerdings entgegen, daß die Ergebnisse von SATTER et al. (1973) auch so interpretiert werden können, daß z.B. Na^+, NO_3^- und Br^- genauso geeignete Osmotika sind bei der Fiederblättchenbewegung von Albizzia wie eben K^+ und Cl^-. Natürlicherweise kommt sowohl bei Samanea (SATTER et al. 1982), bei Phaseolus (4.3.2.) und wohl auch bei Albizzia Na^+ weder in der Zellwand noch im Symplasten in großer Menge vor. Phaseolus-Blätter schwingen in 1/10 S_1, das über den Transpirationsstrom aufgenommen wird, viele Tage lang in gewohnter Weise. Auch in S_1 gealterte Schnitte, die vermutlich mit Na^+ voll geladen sind (5.2.1.3.), zeigen ein normales elektrisches Verhalten. Wenn Na^+ bei der Blattbewegung einen phasenverschiebenden Effekt hat, so mag das mehr an der verwendeten Ionenkonzentration liegen als an der Ionenspezies. Bei Phaseolus lösen hochkonzentrierte KCl-Pulse Phasenverschiebungen aus (BÜNNING, MOSER 1973; WANNER 1982).

Wie in Abb. 24 B dargestellt, reagiert das an Extensorzellen frischer Schnitte abgeleitete Membranpotential im Tagesgang unterschiedlich stark auf CN^-: bei Schnitten aus der Nachtstellung ist die durch CN^- ausgelöste Depolarisierung größer als bei Schnitten aus der Tagstellung. Mit dem negativeren Ruhepotential geht eine stärkere CN^--Depolarisierung einher. Mit dem Ersatzschaltbild einer Membran (Abb. 25) kann das erklärt werden: Das Potential wird negativer, wenn die Leitfähigkeit der Pumpe relativ zur passiven Leitfähigkeit zunimmt. Weil der Pumpenstrom während der

Nachtstellung stärker dominiert, wird er durch CN^- auch mehr gehemmt. Die relative Zunahme der Pumpenleitfähigkeit erklärt sich mit den Ergebnissen der K^+-Auswaschversuche (Tab. 15). Danach beträgt der K^+-Fluß (der elektrischen K^+-Leitfähigkeit identisch) von frischen Schnitten, die mit Salzlösungen hoher Osmolarität ausgewaschen werden, während der Tagstellung 0.13 µmol K^+/mg TG·min, während der Nachtstellung hingegen nur 0.052 µmol K^+/mg TG·min. Weil also der K^+-Fluß nachts geringer ist, negativiert der (als konstant vermutete) elektrogene Ionenfluß das Membranpotential stärker.

Die Verringerung der K^+-Konzentration im Bademedium, deren Wirkung in Abhängigkeit von der Phasenlage in Abb. 24 C dargestellt ist, wirkt sich über den K^+-Kanal in Abb. 25 auf das Membranpotential aus. Eine Erniedrigung der K^+-Konzentration macht das K^+-Diffusionspotential negativer. Das ist meßbar als Hyperpolarisierung. Diese ist geringer während der Nachtstellung, weil die K^+-Leitfähigkeit in dieser Bewegungsphase geringer ist (Tab. 15). Während der Tagstellung ist die K^+-Leitfähigkeit größer; entsprechend deutet die gestrichpunktete Kurve auf absolut größere Beträge bei der Hyperpolarisierung hin. Der Knick in der Kurve - also der tatsächlich beobachtete Verlauf von $\Delta E_m(S_1 \rightarrow S_2)$ während der späten Tagstellung- weist auf einen zweiten beteiligten, sich circadian ändernden Transportprozeß hin. Der Knick läßt sich erklären mit einer während der späten Tagphase vorübergehend erhöhten Cl^--Leitfähigkeit. Diese kurzzeitige Erhöhung ändert nicht den Verlauf der Kurven A und B in Abb. 24, weil eine zusätzliche "Positivierung" von E_m durch große Cl^--Flüsse vom Cytoplasma nach außen nicht sichtbar werden kann; denn E_m ist in dieser Bewegungsphase schon weniger negativ.

Mit der Interpretation von einer veränderlichen Cl^--Leitfähigkeit der Extensorzellen in frisch gefertigten Schnitten im Tagesgang kommt man zu einem zentralen Thema: Cl^--Transport in höheren Pflanzenzellen. Das Wissen darüber verdichtet sich immer mehr dahingehend, daß in glykophytischen Zellen Cl^- durch Protonen-Chlorid-Cotransport aufgenommen wird, der energetisiert wird durch eine elektrogene Protonenpumpe (SANDERS 1983). Denn Tatsache ist, daß in glykophytischen

Zellen das Cl^- innen in der Zelle immer höher konzentriert ist als außen und daß das negative elektrische Potential einen passiven Uniport von Anionen nach innen verhindert. D.h. Cl^- muß gegen den elektrischen und gegen den Konzentrationsgradienten in die Zellen aufgenommen werden. Die beschriebene Cl^--Aufnahme in Pflanzenzellen via 2 H^+/Cl^--Cotransport wird vermutlich auch für Phaseolus zutreffen. SATTER, GALSTON (1981) und SANDERS (1983) machen darauf aufmerksam, daß die Hyperpolarisierung von Flexorzellen frischer Schnitte, wenn 80% des Cl^- im Bademedium durch NO_3^- ersetzt werden (GRADMANN, MAYER 1977), im Sinne eines reduzierten Cotransports interpretiert werden kann. Die elektrischen Meßergebnisse an Extensorzellen frischer Schnitte (Abb. 24) können auch als unterschiedliche Leistungen des $2H^+/Cl^-$-Cotransportsystems interpretiert werden, sofern die Schnitte noch teilweise tagesperiodisch sich ändernde in situ Verhältnisse widerspiegeln: Während der Tagstellung (großes Extensorzellvolumen) wird über den $2H^+/Cl^-$-Carrier viel Cl^- nach innen transportiert; entsprechend gering sind das gemessene Ruhepotential (wegen des Transports von positiver Ladung) und die registrierte CN^--Depolarisierung. Hingegen ist das Ruhepotential während der Nachtstellung (kleines Zellvolumen) stärker negativ und die CN^--Depolarisierung größer, weil der elektrochemische Protonengradient nicht durch die Cotransportprozesse belastet wird.

Ob die für Extensorzellen von frischen Schnitten interpretierte, kurzzeitige Erhöhung der Cl^--Leitfähigkeit während der späten Tagphase und zu Beginn der Senkungsbewegung wirklich im intakten, in situ Motorgewebe realisiert ist, kann nicht sicher beantwortet werden. In 5.3.3. wird jedoch von dieser Interpretation ausgehend eine Vorstellung entwickelt von den Transportprozessen, die in situ zu den bekannten, circadianen Volumenänderungen in den Gelenken führen könnten.

Der circadiane Verlauf der Zellwandpotentiale weist auf verschieden große Kationenmengen im DFS hin (Abb. 13). Der negativere Potentialbetrag während der Nachtstellung der Blätter bedeutet eine größere Kationenmenge im DFS im Vergleich zur Situation während der Tagstellung. Das elektrische

Ergebnis spiegelt damit den in situ K^+-Gehalt der Zellwände während der zwei genannten Bewegungsphasen wider (Tab. 11). Das überrascht. Denn auf Grund der Ergebnisse der Inkubationsversuche - 1.5 h langes Inkubieren frischer Schnitte induziert in der Zellwand etwa gleiche Kationenverhältnisse in beiden Bewegungsphasen (Tab. 13) - hätte man auch etwa gleiche Zellwandpotentiale in allen Bewegungsphasen erwarten dürfen. Eine plausible Erklärung für das tatsächliche Ergebnis kann sein, daß bei vielen Schnitten die in situ Verhältnisse des DFS noch nicht vollends zerstört und nivelliert sind durch die aufgezwungene Badelösung S_1. Auch für die Wandpotentialmessungen gilt die in Abb. 8 b dargestellte Verteilung der Experimente innerhalb der eingehaltenen 1.5 h, wonach mehr als die Hälfte aller Messungen im Laufe von 36 min nach der Präparation gemacht wurden. Es kann also gefolgert werden, daß eine neue Gleichgewichtseinstellung in der Zellwand doch länger als 36 min dauert.

5.2. Ionenaustauschexperimente

5.2.1. Aufladevorgänge und Auswaschexperimente mit Radioisotopen

5.2.1.1. Steady-state während der radioaktiven Ladung in situ contra non-steady-state während der Auswaschexperimente an frischen Schnitten

Die in Abb. 21 gezeichneten ^{36}Cl-Aufnahmekinetiken für Extensor- und Flexorgewebe scheinen realistisch zu sein, weil die daraus berechneten Gesamtkonzentrationen an Cl^- im Gewebe (gemittelt über alle drei Kompartimente, wobei die Vakuole volumenmäßig mit ca. 90% dominiert) mit ungefähr 210 mM durchaus anderen bestimmten Cl^--Konzentrationen für Extensorgewebe (ca. 160 mM) und Flexorgewebe (ca. 70 mM, MAYER unveröffentlicht) gleicht. Aus den Zeitkonstanten (270 h fürs Extensorgewebe und 166 h fürs Flexorgewebe) errechnen sich Durchladezeiten von 374 h (= 15.6 Tage) bzw. 230 h (= 9.6 Tage)

für die beiden Gewebe. Die aus den Effluxdaten frischer Schnitte abgeschätzte, maximale Durchladezeit für Extensor- und Flexorgewebe von 85 h ist aber viel kleiner (4.2.2.). Das erlaubt den klaren Schluß, daß in situ die Cl^--Leitfähigkeit der Membranen kleiner ist als bei frisch gefertigten Schnitten. Es bestätigt, daß wirklich ein methodischer Fehler gemacht wurde, darin bestehend, daß Blattgelenksgewebe in situ über den Transpirationsstrom aufgeladen wurde und daß danach aus frisch präparierten Gewebeschnitten die radioaktiven Ionen wieder ausgewaschen wurden. Das heißt, die durch die Methode der Compartmentanalyse bei steady-state Bedingungen gewinnbaren Ergebnisse (Ionenkonzentrationen in und Ionenflüsse aus den zellulären Kompartimenten) sind nicht zu erhalten. Die Diskrepanz der aus ^{36}Cl-Aufnahme- und Auswaschexperimenten abgeschätzten Durchladezeiten belegt zudem erneut, was aus den elektrischen Experimenten (5.1.1. - 5.1.3.) und den K^+-Austauschexperimenten an frischen und 1.5 h lang inkubierten Schnitten (4.3.4.) schon klar geworden ist, nämlich daß durch das Herausschneiden des Gewebes die passiven Ionenleitfähigkeiten von K^+ und Cl^- stark erhöht werden und daß infolgedessen frische Schnitte nicht in situ Membranleitfähigkeitsverhältnisse widerspiegeln. Man kann verwundert sein, daß das Aufsplitten der Auswaschkinetiken in drei eindeutige Komponenten mit in den verschiedenen Experimenten übereinstimmenden Zeitkonstanten möglich war; denn die Flüsse scheinen nicht einmal während des ca. zweistündigen Auswaschexperiments konstant zu bleiben. Die berechneten K^+-Flüsse in Tab. 15, nämlich 0.13 µmol K^+/mg TG·min während der ersten 30 Minuten nach dem Schneiden bzw. 0.039 µmol K^+/mg TG·min 1.5 h später deuten stark darauf hin.

Bei der oben genannten Durchladezeit zwischen 9.6 und 15.6 Tagen für in situ Gewebe via Transpirationsstrom ist zu erwarten, daß zwar einerseits das Gewebe durchgeladen würde, daß sich aber andererseits die im Transpirationsstrom aufgenommenen Salze im Gewebe mit der Zeit anreichern würden, da nur Wasser via Transpiration vom Blatt ausgeschieden wird. Das heißt, man würde gar nicht die in Abb. 21 gefitteten, extrapolierten e-Funktionen erhalten: ein kaum lösbares Dilemma, das gegen Isotopenversuche spricht, die zum Ziel

haben, die in situ Ionengehalte der einzelnen Kompartimente zu bestimmen.

In Tab. 7 ist aufgeführt, daß die $^{36}Cl^-$-Flußkomponenten 2 und 3 im Mittel die gleichen Aktivitätsmengen enthalten. Eine Erklärung dafür kann sein, daß in situ das vermeintliche Cytoplasma (Aktivitätsgehalt I_2) mit seiner Zeitkonstante im Minutenbereich schon durchgeladen ist, das vermeintliche Vakuolenkompartiment (I_3) hingegen bei den untersuchten Inkubationszeiten erst eine Spezifität von ungefähr 0.1 erreicht hat (Tab. 5 und Abb. 21). Wenn wie üblich ein Cytoplasma : Vakuolen - Volumenverhältnis von etwa 1 : 10 angenommen wird (bei gleichen Konzentrationen in den Kompartimenten), würden also die Aktivitätsgehalte der Komponenten 2 und 3 zufällig gleich groß sein. Diese Deutung beinhaltet auch, daß τ_v in situ wesentlich größer ist als im Auswaschexperiment an frischen Schnitten.

5.2.1.2. Identifizierung der schnellsten Komponente 1 bei $^{36}Cl^-$-Auswaschversuchen ist schwierig.

Schätzungsweise muß für die Durchmarkierung der Extensor- und Flexorzellwand eine Zeit von ungefähr 2 h angenommen werden - 1.5 h Latenzzeit plus 5 x τ_1. Folglich müßte bei allen experimentellen Inkubationszeiten in Tab. 5 die Zellwand durchgeladen gewesen sein. Unter dieser Annahme ist der mittlere Cl^--Gehalt in Komponente 1 zu 0.039 µmol Cl^-/mg TG berechnet worden. Falls die Komponente 1 die Zellwand repräsentiert, würde die aus dem Gehalt bestimmte Cl^--Konzentration von 130 mM im WFS der Extensor- und Flexorzellwand enthalten sein bzw. würde diese Konzentration dem entsprechen, was HELFERICH (1959) und DEMARTY et al. (1980) in der Zellwand adsorbiertes Cl^- nennen. Ich halte diese Erklärungsmöglichkeit für unbefriedigend, weil mir diese Konzentration zu hoch erscheint. Es sei denn, irgendwo im Apoplasten ist eine noch viel größere Cl^--Konzentration vorhanden (identisch der Inkubationslösung für Zellwände bei in vitro Versuchen). Aber gerade dies halte ich für ausgeschlossen. Von der 10 mM Cl^--Konzentration der radioaktiven Inkubationslösung kann diese hohe Konzentration nicht herrühren.

Die für voll durchmarkiertes Gewebe bestimmten Cl^--Gehalte und Cl^--Konzentrationen in Tab. 6 (340 - 1260 mM) sind für die Zellwand erst recht unwahrscheinlich. Die großen Mengen an Cl^- könnten jedoch aus den angeschnittenen bzw. anderen verletzten oder gequetschten Zellen kommen. Die fünf Flexorexperimente, bei denen die Komponente 1 in der Auswaschkinetik fehlt (Tab. 5, Abb. 19 a,b), sprechen für diese Interpretation. Dort werden anscheinend die angeschnittenen und verletzten Zellen im allerersten Auswaschintervall (Dauer 15 oder 30 sec; entspricht in der Kinetik dem Meßpunkt zur Zeit 0 min) vollends ausgewaschen. Und aus tiefer innen im Schnitt gelegener Zellwand kommt kein Cl^-. Das Zellsaftvolumen aus den angeschnittenen Zellen - etwa das 2-6fache des Zellwandvolumens, um eine ca. 200 mM Cl^--Konzentration zu ergeben - würde also ca. 6-18% des gesamten Gewebewassers von Schnitten sein. Das könnte zutreffen: zwei angeschnittene Zellschichten und 2-3 intakte Zellschichten im Extensor bzw. 4-6 intakte Zellschichten im Flexor wurden bei 300 µm dicken Schnitten bestimmt (ALLMENDINGER 1983). PITMAN (1965) gibt für die angeschnittenen Zellen bei 1 mm dicken Rote Beete-Schnitten einen entsprechend vergleichbaren Volumenanteil von 15% an.

Eine dritte Möglichkeit, den großen Cl^--Gehalt der Komponente 1 zu interpretieren, bleibt noch. Vielleicht spiegelt die Kinetik der $^{36}Cl^-$-Komponente 1 eine sehr schnelle, exponentielle Abnahme der Cl^--Leitfähigkeit des Plasmalemma wider. Nach dieser Vorstellung würde die durch das Schneiden stark erhöhte Cl^--Leitfähigkeit im Laufe von Minuten abnehmen auf einen konstanten Wert, der dann der nächst langsameren Komponente 2 der Abgabekinetik zugrunde liegt, die traditionell als Ionenaustausch am Plasmalemma betrachtet wird. Daß die schnellste Kinetik bei fünf Flexorauswaschexperimenten fehlt, paßt gut zu dieser Interpretation. Denn in der Regel (eine Ausnahme bei n = 9; Tab. 5) ist die Zeitkonstante τ_1 der Flexorkinetiken kleiner (der ablaufende Prozeß schneller) als τ_1 der Extensorkinetiken.

Welche Erklärung am wahrscheinlichsten ist, kann nicht entschieden werden. Der dritte Erklärungsansatz würde auch wieder

darauf hinweisen, daß mehr oder weniger schnelle Leitfähigkeitsänderungen (Abnahme) bei frisch gefertigten Schnitten eine große Fehlerquelle bzw. ein wichtiger, zu berücksichtigender Aspekt bei Auswaschversuchen und elektrischen Experimenten sind.

5.2.1.3. $^{86}Rb^+$ als Tracer der verschiedenen Kationen der Inkubationslösung

Die verwendete 20 mOsm Inkubationslösung war notwendig, um $^{86}Rb^+$ und $^{36}Cl^-$ über den Transpirationsstrom anzubieten. Schon die radioaktive $Na^{36}Cl$-Lösung allein z.B. war 5.6 mM. Die Bewegung der Blätter war durch die Inkubation in die genannte Lösung nicht im geringsten gestört (eine Inkubation der Blätter in eine 200 mOsm Lösung läßt die Blätter aber sofort welken und absterben). Die Zusammensetzung der 1/10 S_1-Lösung war aber völlig falsch gewählt im Hinblick darauf, $^{86}Rb^+$ als Tracer für K^+ anzubieten. Denn $^{86}Rb^+$ war in diesem Fall Tracer für alle drei enthaltenen Kationen K^+, Na^+ und Ca^{2+}. Das vorgegebene Verhältnis von Na^+ : K^+ = 9 : 1 scheint sich tatsächlich im Cytoplasma und in der Vakuole zu etablieren; denn wenn $^{86}Rb^+$ nur als Tracer für K^+ betrachtet wird (für den Fall, daß die aus den $^{36}Cl^-$-Aufnahmekinetiken der Abb. 21 ableitbaren Spezifitäten auch für die $^{86}Rb^+$-Aufnahme gelten), kommt für Kompartiment 2 und Kompartiment 3 in Extensor und Flexor heraus, daß im Mittel 7.8 mal mehr (± 1.8 SF) Cl^--Ionen als K^+-Ionen in den Kompartimenten vorhanden sind. Wie gesagt, vermutlich repräsentieren die genannten Kompartimente Cytoplasma und Vakuole; das Überwiegen von Anionen dort ist am einfachsten zu erklären, wenn $^{86}Rb^+$ gleichzeitig auch Tracer für das 9mal mehr angebotene Na^+ ist. Denn dann wäre das Verhältnis (Na^+ + K^+) : Cl^- annähernd 1 : 1. Eine andere Erklärung für das zitierte Ergebnis kann sein, daß die Permeabilitäten der Membranen für Na^+, K^+, $^{86}Rb^+$ und Cl^- sehr unterschiedlich sind und daß dadurch dieses Mißverhältnis zustande kommt.

Die komplexe Zusammensetzung der 1/10 S_1-Lösung war also ein offensichtlicher Fehler. Denn in situ sind im Zellsaft höchstens 2% Na enthalten (4.3.2.). Wegen der hohen spezifischen Aktivität von $^{86}Rb^+$ hätten geringe $^{86}RbCl$-Konzentra-

tionen ($\leq$ 0.1 mM) in der Inkubationslösung gereicht. Und das andere einzige Kation in der Lösung hätte nur K^+ sein dürfen.

Der Gehalt an Kationen in der Zellwand wurde zu 0.085 bzw. 0.17 µequiv/mg TG bestimmt. Er ist zu klein; denn auf Grund der Ergebnisse in Tab. 11 hätten im Mittel ungefähr 0.35 µmol einwertige Kationen/mg TG erwartet werden können. Zwei mögliche Gründe für die Diskrepanz seien genannt. 1. Das Zellwandkompartiment ist vielleicht wie das Cytoplasma- und Vakuolenkompartiment noch nicht durchmarkiert gewesen trotz 17-41 h Inkubation. Oder 2. die angebotene 1/10 S_1-Lösung induziert sehr niedrige Kationengehalte in der Zellwand. Darauf weisen in Tab. 9 Experimente hin, bei denen die Blattgelenke vor dem Auswaschen einen Tag lang via Transpirationsstrom in 10 mM KCl inkubiert worden sind. Die Inkubation senkte den mittleren K^+-Gehalt der Zellwand während der Tagstellung von 0.27 µmol K^+/mg TG auf 0.09 µmol K^+/mg TG.

Die Komponenten 2 und 3 können wie bei den $^{36}Cl^-$-Experimenten nicht zuverlässig identifiziert werden, weil nur bei durchmarkierten Kompartimenten/Geweben, konstanten Ionenflüssen und konstant bleibendem Volumen aus dem Aktivitätsgehalt I die Konzentration des betreffenden Ions in dem Kompartiment abgeschätzt werden kann. Alle drei Voraussetzungen sind jedoch nicht erfüllt.

5.2.1.4. Zellwandvolumen nach der ^{14}C-Inulin-Methode

Ob die Zellwand nach 18-26 h Inkubationszeit mit ^{14}C-Inulin durchmarkiert ist, ist experimentell nicht geklärt worden. Das Ergebnis aber, 2.3 - 3.7 Volumenprozente vom gesamten Gewebewasser für das Apoplastenvolumen (Tab. 16), stimmt in der Größenordnung sehr gut mit anderen veröffentlichten Werten überein. BRIGGS et al. (1958) bestimmten das Volumen des DFS in Rote Beete-Schnitten zu 2 - 3 % des Gewebevolumens. PITMAN et al. (1974) berechneten bei Gersteblättern ein mittleres apparentes Volumen des WFS von 0.041 ml/g FG; das sind ungefähr vier Volumenprozente. Für den DFS wird 0.013 ml/g FG angegeben; das ist ca. ein Volumenprozent. Der Free Space (nur Pectinmittellamelle, Zelluloseschichten ausgenommen) in Blättern von Weizenpflanzen wird auf 3 - 5 % geschätzt

(CROWDY, TANTON 1970). Bei Lemna beträgt das relative Zellwandvolumen 2.6 % vom Lemna-Frischgewicht (DEMARTY et al. 1977).

Man kann sich fragen, welcher Teil der Zellwand mit der Inulinmethode erfaßt wird, der WFS oder der DFS oder beide zusammen. Beim Inulin (Polyfructosan) ist vermutlich nur das letzte Zuckermolekül durch eine $-^{14}COOH$-Gruppe radioaktiv markiert. Also ändern sich wahrscheinlich die sauren/basischen Eigenschaften des ganzen Zuckermoleküls nicht. Versuche bei Chara zeigen, daß ^{14}C-Mannitol in die gesamte Zellwand (DFS + WFS) diffundiert (DAINTY, HOPE 1959). Wenn die anionischen (sauren) Eigenschaften des Inulinmoleküls wichtig wären, würde es bei basischem pH aus dem DFS ausgeschlossen bleiben. Bei der Grünalge Enteromorpha ist nachgewiesen worden, daß ^{14}C-Inulincarbonat als effizienter Cl^--Tracer verwendet werden kann, weil es in gleicher Weise wie Cl^- von homogenisierter Zellwand adsorbiert wird (RITCHIE, LARKUM 1982). Das bedeutet in der Vorstellung von WFS und DFS, daß es wie Cl^- nur den WFS füllt.

5.2.2. Kationengehalt der Zellwand in situ im circadianen Rhythmus

Das verwendete Verfahren - K^+ in der Zellwand und am Plasmalemma auszutauschen, damit auszuwaschen und aus der Auswaschkinetik den K^+-Gehalt in der Zellwand zu bestimmen - ist von der Methode der Compartmentanalyse via Tracerefluxkurven abgeleitet worden. Statt der Menge an Radioaktivität werden photometrisch K^+-Konzentrationen bestimmt. Man erhält auch zweiphasige Kinetiken. Das schnelle Kompartiment (Zellwand) gibt bei verschiedenen Experimenten das K^+ (im Austausch gegen Na^+, Li^+, Rb^+ oder Ca^{2+}) mit übereinstimmenden Halbwertszeiten von 0.78 min, 0.77 min und 0.83 min ab (Tab.9, Tab. 10, Tab. 12). Der Vergleich mit der Halbwertszeit der schnellsten Komponente bei den $^{86}Rb^+$-Versuchen (0.91 min) zeigt eine sehr gute Übereinstimmung. Auch die Halbwertszeiten der nächstlangsameren Komponente (Austausch am Plasmalemma), 11.18 min, 6.66 min bzw. 6.19 min bei den verschiedenen nichtradioaktiven Auswaschexperimenten und 7.19 min bei $^{86}Rb^+$-Effluxversuchen liegen gut beieinander. Das bestätigt, daß auch bei dieser

Austauschmethode, die keine Radioisotopen verwendet, Vorgänge in der Zellwand und am Plasmalemma voneinander getrennt erfaßt werden. Der Vorteil ist, daß die Pflanzen/Gelenke nicht vorher via Transpirationsstrom radioaktiv inkubiert werden müssen. Damit entfallen Fehlerquellen (zu kurze Inkubationszeit, ungeeignete Zusammensetzung und Konzentration der Inkubationslösung).

In Tab. 11 ist das wichtigste Ergebnis dieser Auswaschversuche zusammengestellt: der in situ K^+-Gehalt der Extensorzellwand schwankt im Verlauf der circadianen Blattbewegung. Und zwar ist während der Tagstellung, wenn die Extensorzellen im Volumen groß sind, signifikant weniger K^+ in der Zellwand (0.22 µmol/mg TG) als während der Nachtphase (0.48 µmol/mg TG), wenn das Blatt abgesenkt ist, d.h. die Extensorzellen Ionen und Wasser wieder abgegeben haben. Was bedeuten diese Ergebnisse? Erstmal wie zuverlässig sind die experimentell bestimmten Werte für den K^+-Gehalt der Zellwand? In den Kinetiken der Abb. 23 sieht man, daß die K^+-Konzentration des ersten oder der ersten beiden gesammelten Eluate nicht auf der Geraden liegen, die immer durch die darauf folgenden Punkte (nach der Differenzbildung) gelegt werden konnte und die die Auswaschkinetik der Zellwand darstellt. Diese darüberliegenden Werte müssen daher rühren, daß der Zellsaft aus den angeschnittenen Zellen bzw. die anhaftende Inkubationslösung von inkubierten Schnitten abgewaschen werden. Wie stark dieser plötzlich durchs Schneiden vorhandene Zellsaft in tiefer im Schnitt liegende Zellwand (WFS) eindringt und ob er dort innerhalb von höchstens zwei Minuten Änderungen im DFS induziert, ist nicht leicht zu beantworten. Zwei Befunde sprechen für eine zu vernachlässigende Kontamination: 1. der geringe K^+-Gehalt der Zellwand während der Tagphase trotz einer möglichen Kontamination; 2. wurde das Vorhandensein circadianer Unterschiede im Zellwandpotential frischer Schnitte in S_1 dahingehend interpretiert, daß eine neue Gleichgewichtseinstellung in der Zellwand länger als eine halbe Stunde dauert (5.1.4.).

Glücklicherweise liegen zum Vergleich auch Zahlen vom K^+-Gehalt der Extensorzellwand von inkubierten Schnitten vor

(Tab. 13). Es ist augenfällig, daß vier Werte in Tab. 13, dem Betrag nach zwischen 0.44 und 0.55 µmol K^+/mg TG nach 1.5 h Inkubation in gepufferter basischer 10 mM KCl-Lösung mit oder ohne EGTA, dem in situ K^+-Gehalt der Zellwand während der Senkungsbewegung und während maximaler Nachtstellung (0.46 bzw. 0.48 µmol K^+/mg TG, Tab. 11) sehr ähnlich sind. Die an inkubierten Schnitten gewonnenen Daten sind wertvoll, weil bekannt ist, welche K^+-Konzentration im WFS sein wird, nämlich die außen vorgegebene, und weil Konzentrationsabschätzungen für den DFS vorgenommen werden können, wenn Werte für Free Space Volumina zur Verfügung stehen. Wie bei inkubierten Schnitten von Rote Beete und Gerstenblättern (PITMAN 1965; PITMAN et al. 1974) wird zum Rechnen auch für inkubierte Extensorschnitte von Phaseolus angenommen, daß ca. 20% des Feuchtgewichts (Gewicht = Volumen), also 20 Volumenprozente auf den wirklichen WFS innerhalb der Zellwand, auf die mit Lösung gefüllten Interzellularräume und die beschädigten bzw. angeschnittenen Zellen entfällt. Wenn die vorgelegte 10 mM K^+-Konzentration in Rechnung gesetzt wird bei einem TG/FG-Verhältnis von 5.02 % (± 0.40 SF; n = 10) bei den Inkubations- und Auswaschbedingungen der Gruppen III - VI in Tab. 13, ergibt das 0.04 µmol K^+/mg TG, das in dem oben definierten WFS von inkubierten Extensorschnitten enthalten ist. Eine größere K^+-Menge dort ist wenig wahrscheinlich. Also sind im Mittel 0.49 - 0.04 = 0.45 µmol K^+/mg TG im DFS der Zellwand inkubierter Extensorschnitte enthalten. Dieser maximale Gehalt an K^+ im DFS des Extensors, 0.45 µmol/mg TG, gleicht genau einem anderen Wert, 0.43 µequiv/mg TG, der die maximale Menge an fixierten Anionen der Phaseolus-Extensorzellwand angibt (SCHUBERT 1982). Zu dessen Bestimmung wurden in 10 mM KCl-Lösung äquilibrierte Extensorzellwände in NaOH gegen HCl titriert. Beide Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß in situ in der Extensorzellwand während der Senkungsbewegung und während der Nachtstellung die maximale Festladungsmenge realisiert ist, eben abgesättigt durch die experimentell bestimmte K^+-Menge (0.46 µmol/mg TG während der Senkungsbewegung, 0.48 µmol/mg TG während der Nachtstellung, Tab. 11).

Da das Volumen des DFS inkubierter Schnitte nicht bekannt ist, werden mögliche, maximale Konzentrationen von K^+ im DFS für verschiedene Volumina abgeschätzt:

bei 2% DFS-Volumen vom FG	1130 mM K^+
bei 3% "	753 mM K^+
bei 5% "	452 mM K^+.

Die mit ^{14}C-Inulin bestimmten in situ Zellwandvolumina (Tab. 16) werden zur Abschätzung nicht verwendet, da ungeklärt ist, ob das ^{14}C-Inulinmolekül teilweise aus der Zellwand (Donnansystem) ausgeschlossen bleibt oder nicht. Bei Bezug auf den Inulinraum (0.32 µl/mg TG, Tab. 16) käme eine noch größere K^+-Konzentration (1406 mM) für den DFS heraus. Aus dem größten, mittleren Extensorzellwandpotential bei frischen Schnitten wurde in 5.1.2. eine Aktivität von 704 mM einwertigen Kationen und fixierten Anionen bestimmt. Die Größenordnung für die maximale Konzentration an einwertigen Kationen und fixierten Anionen im DFS der Extensorzellwand bei Phaseolus stimmt gut überein mit Daten von anderen Pflanzen: bei Chara sind es 0.8 equiv/l (DAINTY et al. 1960), bei Enteromorpha 0.7 equiv/l (RITCHIE, LARKUM 1982), bei Rote-Beete-Schnitten 0.56 equiv/l (BRIGGS et al. 1958), bei Lemna 0.44 equiv/l (DEMARTY et al. 1978) und bei inkubierten Gersteblättern 0.28 equiv/l (PITMAN et al. 1974).

Bei der durchgeführten Abschätzung der maximalen Festladungskonzentration im DFS wurde bereits die jetzt folgende Interpretation der Ergebnisse in der Tab. 13 vorweggenommen. Die K^+-Gehalte in der Reihenfolge 0.34, 0.47 und 0.55 µmol/mg TG bzw. 0.26, 0.44 und 0.49 µmol/mg TG (die 0.04 µmol/mg TG, die im kinetisch nicht zu unterscheidenden WFS enthalten sind, werden vernachlässigt) entsprechen Punkten auf der Neutralisations-/Dissoziationskurve der -COOH-Gruppen von Zellwänden (zweierlei pH-Werte der Inkubationslösungen mit bzw. ohne EGTA; DAINTY et al. 1960; PITMAN 1964; MORVAN et al. 1979). Bei niedrigem pH (pH 6) sind einige $-COO^-$-Gruppen durch H^+ neutralisiert, bei sehr niedrigem pH würden alle Carboxylgruppen als -COOH vorliegen, d.h. kein K^+ würde zum Absättigen von negativen Ladungen notwendig sein. Hingegen sind bei hohem pH (pH 8-9) wohl alle Säuregruppen zu $-COO^-$ dissoziiert;

entsprechend viel K^+ ist zum Ladungsausgleich im DFS enthalten. Durch EGTA in der Inkubationslösung bei gleichem pH werden vermutlich doch einige vorhandene $-COO^-Ca^{2+}{}^-OOC-$ Bindungen schneller gelöst, auch wenn die Messwerte nicht signifikant verschieden sind von denen der Kontrollexperimente. Die Erklärung kann sein, daß durch den starken Komplexbildner EGTA die relative Azidität der Säuregruppen verändert wird (MORVAN et al. 1979). Daß durch die eineinhalbstündige Inkubation in der Zellwand statistisch die gleiche K^+-Menge induziert wird (Tab. 13), obwohl anfangs in Abhängigkeit von der Bewegungsphase signifikante in situ Unterschiede zwischen Tag und Nacht vorhanden waren (Tab. 11), wurde schon herausgestellt und leuchtet auch wegen der experimentellen Situation ein: die Zellwand allgemein stellt ihr Säure-/Basegleichgewicht dem pH-Wert, der Osmolarität und der Ca^{2+}-Konzentration in der Badelösung entsprechend ein.

Die unterschiedlichen in situ K^+-Gehalte der Extensorzellwände in verschiedenen Bewegungsphasen können danach zusammenfassend so interpretiert werden: tagsüber ist ein Teil der $-COO^-$-Gruppen des DFS zur Säure (-COOH) neutralisiert, während der Senkungsbewegung und bei maximaler Nachtstellung der Blätter aber liegen alle Säuregruppen dissoziiert vor und sind durch K^+ abgesättigt. Auch für Samanea gibt es qualitative Ergebnisse bezüglich des K^+- und Cl^--Gehalts der Extensorzellwand während der verschiedenen Bewegungsphasen (CAMPBELL et al. 1981; SATTER et al. 1982). Mit der Röntgenmikrosonde, die eine Unterscheidung des Zellwandkompartiments vom Symplastenkompartiment ermöglicht, wurde während der Tagstellung ein ca. 3-4fach größerer K^+-Gehalt bestimmt als während der Nachtstellung. Während der Senkungsbewegung allerdings wurde die 2-3fache K^+-Menge der Tagstellung gefunden. Die K^+-Gehalte bei Tag- und Nachtstellung ändern sich demnach bei Samanea und Phaseolus gerade entgegengesetzt. Der Grund dafür ist nicht klar. Auch bei Samanea kann eine Kontamination der Zellwand während der Gewebepräparation nicht ausgeschlossen werden (loc. cit.). Daß die K^+- und Cl^--Gehalte in der Zellwand von Samanea sich gleichsinnig und mengenmäßig gleich ändern, ist

meines Erachtens nicht glaubwürdig. Denn bei Phaseolus finden die K^+-Änderungen eindeutig im DFS statt, der Anionen ausschließt. Für Samanea ist experimentell nachgewiesen, daß die fixierten Anionen der Zellwand in den Phasen, wenn wenig K^+ bestimmt wurde, weder durch Na^+ noch durch Ca^{2+} abgesättigt sind (loc. cit.). Deswegen werden auch dort stattdessen Protonen vermutet.

5.3. Schlußfolgerungen, Konzept zum Mechanismus von Volumenänderungen pflanzlicher Zellen

5.3.1. Übereinstimmung mit Verhältnissen beim säureinduzierten Streckungswachstum?

Ein Ergebnis dieser Arbeit ist: es ist weniger K^+ in der Zellwand in der Phase, wenn das Zellvolumen zunimmt/groß ist. Von den Phänomenen her und mit der Idee einer unterschiedlichen Säure-/Basegleichgewichtseinstellung im DFS der Phaseolus-Exzensorzellwand während der verschiedenen Bewegungsphasen läßt sich eine Verbindung herstellen zu dem ganzen Themenbereich "säureinduziertes Zellstreckungswachstum, Wirkung von Pflanzenhormonen über Zellwandansäuerung". Der Kationengehalt der Zellwand, aufgetrennt nach DFS und WFS, ist im Bezug auf Säure-Wachstum meines Wissens noch nicht bestimmt worden.

Zur Einführung soll kurz dargestellt werden, wie in der Literatur die Säurewirkung erklärt wird. Es ist nachgewiesen, daß eine Erniedrigung des extrazellulären pHs (Ansäuerung der Zellwand) zur Volumenzunahme der Zellen (Streckungswachstum) führt, und zwar durch Zunahme der Dehnbarkeit der Zellwand (RAYLE, CLELAND 1970; HAGER et al. 1971; RAYLE, CLELAND 1972 a; RAYLE 1973).

Eine Hypothese, um die Zunahme der Dehnbarkeit zu erklären, war die Neusynthese von Zellwandmaterial (RAY 1967). Aber der Vergleich von Experimenten in vivo (turgeszente Avena-Koleoptilstücke) und in vitro (Avena-Koleoptilstücke, die mindestens zweimal gefroren und wiederaufgetaut worden waren; der zerstörte, fehlende Turgordruck wurde ersetzt durch eine konstante, dehnende, äußere Kraft) machte diese Hypothese

unglaubwürdig (RAYLE et al. 1970). Denn auch totes Gewebe ließ sich bei plötzlicher pH-Erniedrigung dehnen.

Eine andere weitverbreitete Erklärung ist, daß säurestimulierte Enzyme der Zellwand deren Dehnbarkeit erhöhen. Zwei Enzyme, eine exo-β-1,3-Glucanase und eine endo-1,3-Glucanase, werden beschrieben, deren Eigenart ist, kein pH-Optimum zu haben, sondern mit zunehmender Ansäuerung aktiver zu werden (MASUDA et al. 1970; GOLDBERG 1980). Auch diese Hypothese wird mehrfach angezweifelt (EVANS 1974; SOLL, BÖTTGER 1982 a). Letztere verwendeten Formaldehyd, um die am Säurewachstum möglicherweise beteiligten Enzyme zu denaturieren. Trotz der Behandlung aber zeigten Epidermisstreifen vom Helianthus-Hypokotyl nach wie vor die säureinduzierte Längenänderung. Der säureinduzierte, enzymatische Abbau von β-Glucanen scheint neuerdings eine spezielle Reaktion nur von monokotyledonen Pflanzen zu sein (NISHITANI, MASUDA 1983). Auch CLELAND (1981) möchte der Möglichkeit, daß Zellwanddehnung eher durch Transglykosylation als durch hydrolytischen Mechanismus zustande kommt, mehr Aufmerksamkeit geschenkt sehen.

Als dritte Erklärungsmöglichkeit gelten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Xyloglucan (Hemizellulosematrix) und Zellulose, die abhängig vom pH in der Zellwand gelöst und wieder gebildet werden, was das Aneinandervorbeigleiten von Zellulosemikrofibrillen ermöglicht (KEEGSTRA et al. 1973; EVANS 1974). Diese Vorstellung ist für Epikotylstücke der Azukibohne dahingehend geändert worden, daß nur ein Teil der Xyloglucane durch Wasserstoffbrückenbindung an Zellulose gebunden ist, der größte Teil aber soll durch stärkere, alkalilabile Bindungen an Zellulose gebunden sein (NISHITANI, MASUDA 1983). Die Xyloglucane werden bei den durchgeführten Experimenten durch Säuren und Laugen aus der Zellwand herausgelöst.

Eine vierte Erklärungsmöglichkeit besteht darin, die physikochemischen Eigenschaften der Polygalakturonsäuren, die zum großen Teil die pflanzliche Primärzellwand aufbauen, - d.h. ihren Neutralisations-/Dissoziationsgrad - als ersten Schritt im säureinduzierten Volumenwachstum anzusprechen (MARRÈ et al.

1974 b; SOLL, BÖTTGER 1982 a). Ca^{2+}-Ionen, die zwei $-COO^-$-Gruppen der Polygalakturonsäure verknüpfen, werden durch den erniedrigten pH in der Zellwand aus der Bindung gelöst und die Säuregruppen werden zur Säure neutralisiert. Gegen diese kaum vertretene vierte Hypothese gibt es bisher keine Einwände. Sie wird in dieser Arbeit den ersten drei Hypothesen vorgezogen und im Folgenden ausführlicher diskutiert.

5.3.2. Veränderte Neutralisation/Dissoziation der -COOH-Gruppen des DFS während der circadianen Blattbewegung und beim säureinduzierten Streckungswachstum

Während der Tagstellung ist weniger K^+ im DFS als während der Nachtstellung der Bohnenblätter. Es ist nachteilig für die Zellwanddehnbarkeit und deswegen vermutlich unwahrscheinlich, daß Ca^{2+} während der Tagphase in der Zellwand das fehlende K^+ ersetzt. Denn Ca^{2+} macht die Wand steif und verhindert Zellstreckung (COOIL, BONNER 1957; TAGAWA, BONNER 1957; SOLL, BÖTTGER 1982 a). Bei Ca^{2+}-Effekten muß immer unterschieden werden, ob die in der Literatur beschriebene Wirkung in der Stabilisierung von Zellmembranen besteht (MARRÈ et al. 1974 b) oder in der Absättigung von den $-COO^-$-Gruppen der Zellwand. Abhängig vom pH, der Konzentration an monovalenten Kationen und im Experiment auch von der Existenz eines Komplexbildners wie EGTA kann natürlich Ca^{2+} mit der Zeit aus der Zellwand gelöst werden (DEMARTY et al. 1977; SOLL, BÖTTGER 1982 a). Na^+ kommt in der Zellwand der Motorzellen von Pulvini in keiner Bewegungsphase nennenswert vor. Das belegen eigene Versuche (4.3.2.) und auch die Arbeiten von SATTER, GALSTON (1981). Daß die absolute Menge der Säure/Basegruppen im Tagesgang der Bewegung abnimmt und zunimmt, soll ausgeschlossen sein.

Auf Grund der eigenen experimentellen Befunde und nach eingehendem Studium der Vorgänge beim säureinduzierten/IES-induzierten Streckungswachstum komme ich zu der Vorstellung, daß beim säureinduzierten Streckungswachstum und bei der Volumenzunahme der Extensorzellen des Bohnenblattgelenks während der Tagstellung derselbe Mechanismus abläuft.

Folgende Einzelfakten und Zusammenhänge wären von Bedeutung:
1. Protonenpumpen am Plasmalemma, die den pH in der Zellwand erniedrigen können. Die Ergebnisse, daß Atmungsinhibitoren wie KCN, DNP und NEM (N-Äthylmaleimid) das auxininduzierte Wachstum hemmen (CLELAND 1968) und daß die Begasung mit Stickstoff die Ansäuerung des Mediums schlagartig reduziert (RAYLE, CLELAND 1980), deuten auf die Inhibition einer Protonenpumpe hin. Bei Phaseolus induzieren über den Transpirationsstrom angebotenes CN^- und N_3^- prompt die Senkungsbewegung der Blätter bzw. verlängern die Dauer der Nachtstellung, wenn die Blätter beim Übergang in die Nachtstellung waren (MAYER 1981). Das ist ebenso zu verstehen als Inhibition einer Protonenpumpe, was sofort die Dissoziation der fixierten Säuregruppen der Zellwand zur Folge haben könnte (siehe unten).
2. Die fördernde Wirkung von Hormonen wie Auxin und Fusicoccin würde auch über eine Stimulierung der Protonenpumpe gehen (MARRÈ et al. 1974 a). Beispielsweise bewirkt die äußerliche Auxinapplikation auf der Oberseite des Bohnenblattgelenks (Flexor), daß nach ca. 10 min Verzögerung das Blatt sich senkt, d.h. das Motorgewebe am Applikationsort direkt sich ausdehnt (KRIEGER 1978).
3. Der erniedrigte pH in der Zellwand verschiebt das Säure-/Basegleichgewicht der Polygalakturonsäuren zu mehr undissoziierter Säure. Und genau darauf scheint es anzukommen. Denn Na^+ und K^+ können zwar langsam Ca^{2+}-Ionen an den fixierten Anionen verdrängen, aber die Wirkung von Na^+ und K^+ auf die Geschwindigkeit der Längenzunahme der Zellwand, verglichen mit HCl, ist unbedeutend (SOLL, BÖTTGER 1982 a). Liegen die Säuregruppen der Zellwand aber teilweise undissoziiert/neutralisiert vor, scheint die Zellwand dehnbarer zu sein. Gleichzeitig ziehen die -COOH-Gruppen viel weniger Wasser (sind weniger hydratisiert) als die Ionenpaare $-COO^-K^+$ oder $-COO^-Ca^{2+}\ ^-OOC-$ z.B.. Das bedeutet, daß der osmotische Term π in der Wasserpotentialgleichung der Zellwand ($\Psi_w = P - \pi - \tau$) geringer und damit auch das Wasserpotential weniger negativ wird. Das ist vermutlich ein entscheidender Punkt, da die Konzentration der fixierten Anionen sehr groß ist. Veröffentlichungen von COSGROVE, CLELAND (1983 a) und COSGROVE,

CLELAND (1983 b) stellen ebenso Überlegungen zu diesem Problem an. Als Folge der Reduzierung von π in der Zellwand wäre die Wasseraufnahme/Volumenzunahme von Zellen osmotisch nicht mehr behindert. Es ist nachgewiesen, daß eine plötzlich zusätzlich gegebene Mannitolkonzentration von 100 mM selbst bei pH 3 das Wachstum hemmt (RAYLE, CLELAND 1972 b) und weiter, daß zunehmende Konzentrationen von Mannitol (bis 200 mM) progressiv die Zellstreckung hemmen, ohne aber die durch IAA und Fusicoccin gesteigerte pH Erniedrigung im Medium zu unterdrücken (MARRÈ et al. 1973). Außerdem würde durch die Protonierung bei Phaseolus K^+ aus dem DFS freigesetzt (wie bei Erbsen-Internodienstücken, MARRÈ et al. 1974 b) und würde zur passiven Aufnahme in die Zellen bereit stehen. Doch dieser Effekt ist nur vorteilhaft, wenn auch genug Cl^- in der Zellwand zur Aufnahme über das Plasmalemma vorhanden ist bzw. nachkommen kann. Es sei denn, daß Malat erstmal als Gegenion für das aufgenommene K^+ in der Vakuole zur Verfügung steht (SCHNABL 1980). Der geringere Ausschluß von Anionen aus der Zellwand bei weniger negativen Festladungen würde eine bessere Cl^--Leitfähigkeit der Zellwand bedeuten. Der größere, effektive Protonengradient über dem Plasmalemma durch die Aktivität der Protonenpumpe ist für die geforderte "energetisierte" Cl^--Aufnahme über ein 2 H^+/Cl^--Cotransportsystem günstig. Die Pufferwirkung von schwachen Säuren und den zugehörigen Salzen ist dann am größten, wenn beide äquimolar vorliegen. Das scheint während der Tagphase in der Zellwand eher gegeben. Vielleicht sind konstante pH-Verhältnisse für pH-abhängige Membrantransportprozesse wichtig. Außerdem scheint man auch beim pK_s-Wert der Pektinsäuren die größte Änderung in deren mechanischer Festigkeit zu erhalten (SOLL, BÖTTGER 1982 b).

5.3.3. Modellvorstellung von Transportprozessen, die zu circadianen Volumenänderungen der Extensorzellen führen.

Frische, mehr aber noch gealterte Schnitte weisen eine elektrogene Komponente im Membranpotential auf. Wegen der Ähnlichkeit der Spannungsantwort von Extensorzellen in situ und in gealterten Schnitten auf Licht-aus/Licht-an wurde geschlossen, daß auch in situ die mutmaßliche Protonenpumpe am Plasmalemma das

Membranpotential stark negativiert. Zum Einen wird durch die Aktivität der Pumpe vermutlich beim Übergang zur Tagstellung und während der Tagstellung der pH-Wert der Zellwand erniedrigt, wodurch ein Teil der $-COO^-$-Gruppen protoniert wird (Tab. 18). Das macht die Zellwand dehnbarer und verkleinert den osmotischen Term des Wasserpotentials der Zellwand. Zum Anderen kann der aufgebaute elektrochemische Gradient das vermutete 2 H^+/Cl^--Cotransportsystem antreiben, wodurch Cl^- in die Zellen aufgenommen wird; K^+ wird ebenso passiv entsprechend dem elektrochemischen Gradienten aufgenommen, und Wasser folgt osmotisch dem resultierenden Salztransport (K^+, Cl^-). Die Zellen nehmen so an Volumen zu.

Der Cl^--Aufnahme in die Zellen wird vermutlich ein Cl^--Leck nach außen entgegenwirken. Vielleicht hängt es von der Größe dieses Lecks ab, ob Cl^- netto in die Zelle aufgenommen oder abgegeben wird. Cl^- leckt dauernd passiv nach außen, weil der elektrische Gradient und der Konzentrationsgradient das Anion nach außen drängen. Tagesperiodische Volumenänderungen können also zustandekommen, wenn sich an der Richtung des Netto-Cl^--Stromes etwas ändert. Vier Variationsmöglichkeiten sind denkbar: 1. Eine geringere Leistung z.B. der Protonenpumpe ändert die elektromotorische Kraft sowohl für den 2 H^+/Cl^--Cotransport wie auch für das Cl^--Leck. 2. Im Tagesgang der Blattbewegung kann die Leitfähigkeit des Cotransportsystems selber verändert werden. 3. Variable Transportleistungen beim Cotransport entstehen aber auch durch Änderung einer der vier Substratkonzentrationen H^+_c, Cl^-_c, H^+_w, Cl^-_w (SANDERS 1983). 4. Das Cl^--Leck (passive Cl^--Leitfähigkeit) ändert sich tagesperiodisch. Bezüglich der ersten drei Möglichkeiten gibt es keine experimentellen Hinweise bei Phaseolus; die vierte Denkmöglichkeit ist jedoch experimentell konkretisiert. Denn die Ergebnisse in Abb. 11 wurden interpretiert mit einer kurzzeitig erhöhten Cl^--Leitfähigkeit bei frischen Schnitten während der späten Tagphase und zu Beginn der Senkungsbewegung. Letztlich ist nicht klar, ob die an frischen Schnitten gefundene, erhöhte Cl^--Leitfähigkeit ein verstärktes Cl^--Leck in situ getreu widerspiegelt. Durch die stärkeren, passiven Cl^-- und

mitfolgenden K^+-Flüsse aus den Zellen in den WFS der Zellwand am Ende der Tagphase könnte im DFS das Gleichgewicht wieder verschoben werden hin zu sehr viel dissoziierten $-COO^-$-Gruppen, wobei wiederum K^+ zum Ladungsausgleich dient. Das kann bedeuten, daß der DFS in der Folge osmotisch "mithilft", das Wasser aus den Zellen zu ziehen. Diese Modellvorstellung wird unterstützt durch zum Teil schon genannte, experimentelle Befunde. Über den Transpirationsstrom verabreichte Pulse von CN^- und N_3^-, aber auch in gleicher Weise angebotene, hochkonzentrierte KCL-Pulse induzieren prompt die Nachtstellung der Bohnenblätter (MAYER 1981; WANNER 1982). Die Erklärung wäre, daß die Inhibitoren die Protonenpumpe hemmen und damit die ständige Ansäuerung der Zellwand stoppen. Die Folge wäre die sofortige Dissoziation der -COOH-Gruppen des DFS. Hochkonzentrierte KCl-Pulse würden ebenso über den WFS im DFS die maximal mögliche Menge an $-COO^-$-Gruppen induzieren.

6. Anhang: Beobachtungen bei den elektrischen Messungen, die bisher ungeklärt sind, die aber nicht verlorengehen sollen.

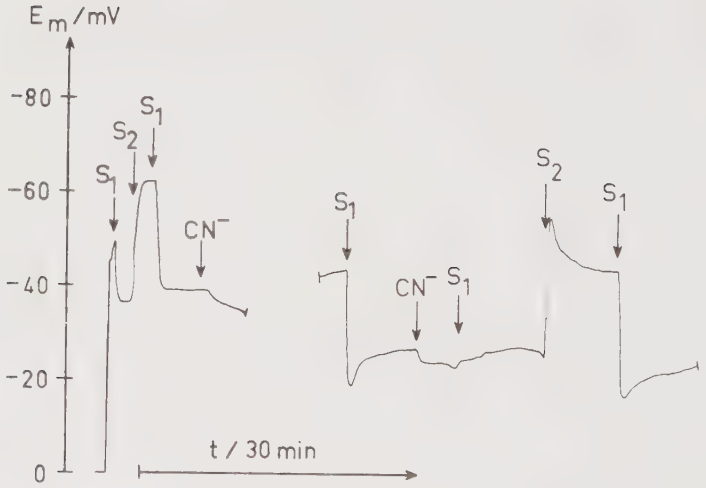

Abb. 1 Zwei mögliche, unterschiedliche Verläufe des Membranpotentials von Extensorzellen frischer Schnitte als Reaktion auf die Änderung der K^+-Konzentration im Bademedium ($S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_1$): einmal ein exponentieller Verlauf, das andere Mal eine überschießende Reaktion.

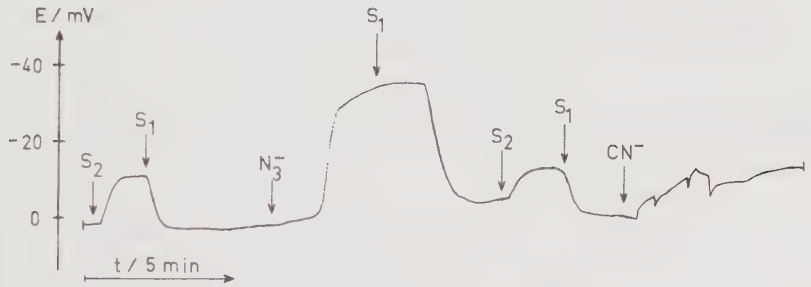

Abb. ii Eigenartiger Potentialverlauf eines gealterten Schnitts in S_1 (zweimal beobachtet): Potential liegt bei O mV; bei Inhibitorgabe (1 mM NaN_3 in S_1 bzw. 1 mM NaCN in S_1) hyperpolarisiert das Potential; es reagiert auch auf $S_1 \longrightarrow S_2$; auffällig sind die unterschiedlichen Latenzzeiten beim Austausch der Badelösungen.

Vermutung: Es wird das Zellwandpotential eines gealterten Schnitts Schnitts abgeleitet. Durch Inhibitoren wird die mutmaßliche Protonenpumpe am Plasmalemma inhibiert; die Folge davon ist eine pH-Änderung (Alkalisierung) in der Zellwand, die unmittelbar zur Dissoziation der -COOH-Gruppen führt. Das Vorhandensein von mehr $-COO^-Na^+$ und $-COO^-K^+$ bedeutet aber ein negativeres Zellwandpotential (Hyperpolarisierung). Das Wandpotential sollte durch durch $S_1 \rightarrow S_2$ nicht verändert werden. Die Parallelableitung von Membran- und Zellwandpotentialen brächte möglicherweise mehr Information über die ausgelösten Vorgänge am Plasmalemma und in der Zellwand.

7. Zusammenfassung

Extensorzellen und Flexorzellen des Laminargelenks von Phaseolus coccineus L. ändern im Verlauf der tagesperiodischen Blattbewegung ihr Volumen. An Schnitten aus dem Gelenk wurden elektrische Potentialmessungen und Ionenaustauschexperimente mit dem Ziel durchgeführt, die Beteiligung elektrischer Membranparameter und des Ionenmilieus der Zellwand am Mechanismus der tagesperiodischen Volumenänderungen zu bestimmen.

Folgende Ergebnisse sind besonders hervorzuheben:
- Extensorzellen "frisch gefertigter" Radialschnitte aus dem Blattgelenk zeigen circadiane Unterschiede im Zellwandpotential (zwischen -37 mV und -50 mV), im Membranpotential (zwischen -35 mV und -44 mV), in der Reaktion des Membranpotentials auf Änderungen der K^+-Konzentration der Badelösung (20 mV bis 28 mV) und in der durch CN^- auszulösenden Membrandepolarisierung (5 mV bis 13 mV). Die elektrische Potentialdifferenz zwischen Vakuole und Zellwand ist bei frischen Schnitten positiv. Extensorzellen in 24 h lang "gealterten" Radialschnitten aber haben ein viel negativeres Membranpotential von durchschnittlich -133 mV, das durch CN^- um 92 mV depolarisiert werden kann. Das Membranpotential gealterter Zellen reagiert im Unterschied zu dem von frischen auf Licht-aus/Licht-an Reize und pH-Änderungen in der Badelösung.

- Durch Ionenaustauschexperimente an frisch gefertigten Extensortangentialschnitten wurde gefunden, daß sich der K^+-Gehalt der Extensorzellwände mit der Stellung der Blätter ändert: der K^+-Gehalt beträgt während der Nachtstellung der Blätter 0.48 µmol/mg TG, während der Tagstellung der Blätter aber nur 0.22 µmol/mg TG. Na^+ und Ca^{2+} anstelle von K^+ in der Zellwand während der Tagstellung können ausgeschlossen werden.

- Durch 1.5 h langes Inkubieren frischer Extensortangentialschnitte in Salzlösungen mit unterschiedlichem pH (mit oder ohne EGTA) werden in der Zellwand phasenunabhängig nahezu die gleichen Kationengehalte induziert; d.h. die in situ vorhandenen

Unterschiede werden durch die Inkubation zerstört.

- Der K^+-Fluß aus dem Symplasten von frisch gefertigten Extensortangentialschnitten, die mit isotonischer Salzlösung ausgewaschen wurden, beträgt während der Tagphase 0.13 µmol K^+/mg TG·min, während der Nachtphase aber nur 0.052 µmol K^+/mg TG·min. Wenn man die Schnitte 1.5 h lang inkubierte, sind die K^+-Flüsse deutlich geringer.

- Die Zeitkonstanten für die radioaktive $^{36}Cl^-$-Aufnahme in in situ Extensor- und Flexorgewebe via Transpirationsstrom (τ_{Ex} = 270 h, τ_{Flex} = 166 h) sind viel größer als die aus den $^{36}Cl^-$-Auswaschkinetiken frischer Schnitte bestimmten Zeitkonstanten (maximal 61 h).

Die elektrischen Ergebnisse werden so interpretiert, daß bei frisch gefertigten Schnitten die passiven Leitfähigkeiten dominieren, hingegen bei gealterten Schnitten die Leitfähigkeit der elektrogenen Pumpe dominiert. Das wird durch die großen K^+-Flüsse und durch die kleinen Zeitkonstanten bei den $^{36}Cl^-$-Auswaschexperimenten bestätigt. Der Vergleich der Reaktionen des Membranpotentials von frischen und gealterten Schnitten auf Licht-aus/Licht-an mit der Reaktion von in situ abgeleiteten Extensorzellen legt den Schluß nahe, daß nicht die Leitfähigkeitsverhältnisse frischer Schnitte, sondern die der gealterten Schnitte die elektrischen Verhältnisse in situ widerspiegeln.

Die circadianen Unterschiede im K^+-Gehalt der Extensorzellwände werden dahingehend interpretiert, daß sich in situ im Tagesgang die Menge an negativen Festladungen in der Zellwand ändert (durch Protonierung von $-COO^-$ zu -COOH oder Dissoziation von -COOH zu $-COO^-$): während der Senkungsbewegung und während der Nachtstellung (kleines Zellvolumen) liegen alle Carboxylgruppen dissoziiert vor und sind durch K^+ abgesättigt, während der Tagstellung (großes Zellvolumen) aber ist circa die Hälfte der Carboxylgruppen protoniert. Dadurch ist während der Tagstellung die osmotische Konzentration in der Zellwand erniedrigt, das Wasserpotential positiver und infolgedessen die Wasseraufnahme in den Symplasten erleichtert bzw. ermöglicht.

Die passive K^+- und Cl^--Aufnahme (Cl^- ziemlich sicher über das $2H^+/Cl^-$-Cotransportsystem) wird vermutlich durch den elektrochemischen Gradienten bewerkstelligt, den die elektrogene Protonenpumpe aufbaut.

Vielleicht ist die aus den elektrischen Experimenten an frischen Schnitten gefolgerte, vorübergehend erhöhte passive Cl^--Leitfähigkeit am Ende der Tagstellung und zu Beginn der Senkungsbewegung der Grund dafür, daß die Konzentration an K^+ und fixierten Anionen in der Zellwand wieder zunimmt, weil die Konzentration an K^+ und Cl^- im WFS der Zellwand zugenommen hat. Dadurch würde das Wasserpotential der Zellwand wieder negativer, was zu entsprechenden Wasserflüssen, d.h. zur Volumenabnahme der Extensorzellen führen würde.

8. Literaturverzeichnis

ALLMENDINGER, M. (1983) Circadiane Änderungen des Kationengehaltes des Apoplasten von Flexor und Extensor des Laminargelenks von Phaseolus coccineus L.. Zulassungsarbeit Universität Tübingen

BATES, G.W., GOLDSMITH, M.H.M., GOLDSMITH, T.H. (1982) Origins and measurement of the membrane potentials in Avena coleoptiles. Plasmalemma and Tonoplast: Their Functions in the Plant Cell (eds. Marmé, D., Marrè, E., Hertel, R. Elsevier Biomedical Press Amsterdam) pp. 241-246

BOELS, H.D., HANSEN, U.P. (1982) Light and electrical current stimulate the same feed-back system in Nitella. Plant & Cell Physiol. 23, 343-346

BORST-PAUWELS, G.W.F.H. (1981) Ion transport in yeast. Biochim. Biophys. Acta 650, 88-127

BRIGGS, G.E., HOPE, A.B., PITMAN, M.G. (1958) Exchangeable ions in beet disks at low temperature. J. Exp. Bot. 9, 128-141

BRIGGS, G.E., HOPE, A.B., ROBERTSON, R.N. (1961) Electrolytes and Plant Cells (Verlag Blackwell Oxford)

BÜNNING, E., MOSER, I. (1973) Lightinduced phase shifts of circadian leaf movements of Phaseolus: comparison with the effects of potassium and of ethyl alcohol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3387-3389

CAMPBELL, N.A., SATTER, R.L., GARBER, R.C. (1981) Apoplastic transport of ions in the motor organ of Samanea. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2981-2984

CLELAND, R. (1968) Auxin and wall extensibility: reversibility of auxin-induced wall-loosening process. Science 160, 192-194

CLELAND, R.E. (1981) Wall extensibility: hormones and wall extension. Plant Carbohydrates II, Extracellular Carbohydrates (Encycl. Plant Physiol. (NS) 13 b, eds. Tanner, W., Loewws, F.A. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York) pp. 225-273

COOIL, B.J., BONNER, J. (1957) The nature of growth inhibition by calcium in the Avena coleoptile. Planta 48, 696-723

COSSGROVE, D.J., CLELAND, R.E. (1983 a) Solutes in the free space of growing stem tissue. Plant Physiol. 72, 326-331

COSSGROVE, D.J., CLELAND, R.E. (1983 b) Osmotic properties of pea internodes in relation to growth and auxin action. Plant Physiol. 72, 332-338

CRAM, W.J. (1968) Compartmentation and exchange of chloride in carrot root tissue. Biochim. Biophys. Acta 163, 339-353

CROWDY, S.H., TANTON, T.W. (1970) Water pathways in higher plants. I. Free space in wheat leaves. J. Exp. Bot. 21, 102-111

DAINTY, J., HOPE, A.B. (1959) Ionic relations of cells of Chara australis. I. Ion exchange in the wall. Aust. J. Biol. Sci. 12, 395-411

DAINTY, J., HOPE, A.B., DENBY, C. (1960) Ionic relations of cells of Chara australis. II. The indiffusible anions of the cell wall. Aust. J. Biol. Sci 13, 267-276

DAINTY, J., HOPE, A.B. (1961) The electric double layer and the Donnan equilibrium in relation to plant cell walls. Aust. J. Biol. Sci. 14, 541-551

DEMARTY, M., AYADI, A., MONNIER, A., MORVAN, C., THELLIER, M. (1977) Electrochemical properties of isolated cell walls of Lemna minor L..Transmembrane Ionic Exchange in Plants. (eds. Thellier, M., Monnier, A., Demarty, M., Dainty, J. CNRS et Université de Rouen) pp. 61-73

DEMARTY, M., MORVAN, C., THELLIER, M. (1978) Exchange properties of isolated cell walls of Lemna minor. Plant Physiol. 62, 477-481

DEMARTY, M., RIPOLL, C., THELLIER, M. (1980) Ion exchange in plant cell walls. Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues (eds. Spanswick, R.M., Lucas, W.J., Dainty, J. Elsevier/North-Holland Biomedical Press Amsterdam, New York, Oxford) pp. 33-44

DENNIS, J.E., GAY, D.M., WELSCH, R.E. (1979) An adaptive nonlinear least-squares algorithm. Mathematics Research Center Technical Summary Report Nr. 2010, University of Wisconsin-Madison (USA)

ENGELMANN, W., SCHREMPF, M. (1980) Membrane models for circadian rhythms. Photochemical and Photobiological Review 5, (ed. Smith, K.C. Plenum Press New York, London) pp. 49-86

ECKHARDT, D. (1982) Einfluß von Vanadat auf die Blütenblattbewegung und auf die Aktivität isolierter ATPasen bei Kalanchoe blossfeldiana. Dissertation Universität Tübingen

ETHERTON, B. (1980) Diskussionsbeitrag zu Demarty et al. (1980) p. 46

EVANS, M.L. (1974) Rapid responses to plant hormones. Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 195-223

FELLE, H. (1974) Analyse der lichtinduzierten Membranpotentiale bei Riccia fluitans. Dissertation Universität Tübingen

FINGERLE, J., GRADMANN, D. (1982) Electrical properties of the plasma membrane of microplasmodia of Physarum polycephylum. J. Membrane Biol. 68, 67-77

FREUDLING, C., MAYER, W.-E., GRADMANN, D. (1980) Electrical membrane properties and circadian rhythm in extensor cells of the laminar pulvini of Phaseolus coccineus L.. Plant Physiol. 65, 966-968

GOLDBERG, R. (1980) Cell wall polysaccharidase activities and growth processes: a possible relationship. Physiol. Plant. 50, 261-264

GRADMANN, D. (1975) Analog circuit of the Acetabularia membrane. J. Membrane Biol. 25, 183-208

GRADMANN, D., SLAYMAN, C.L. (1975) Oscillations of an electrogenic pump in the plasmalemma membrane of Neurospora. J. Membrane Biol. 23, 181-212

GRADMANN, D., MAYER, W.-E. (1977) Membrane potentials and ion permeabilities in flexor cells of the laminar pulvini of Phaseolus coccineus L.. Planta 137, 19-24

GRADMANN, D., HANSEN, U.-P., SLAYMAN, C.L. (1982) Reaction kinetic analysis of current-voltage relationships for electrogenic pumps in Neurospora and Acetabularia. Electrogenic Ion Pumps (Current Topics in Membranes and Transport, vol 16, ed. Slayman, C.L. Academic Press New York) pp. 257-276

HAGER, A., MENZEL, H., KRAUSS, A. (1971) Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. Planta 100, 47-75

HANSEN, U.-P. (1974) Preliminary results of an approach to the quantitative description of the action of light on the membrane potential of Nitella. Membrane Transport in Plants (eds. Zimmermann, U., Dainty, J. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York) pp. 139-145

HASTINGS, J.W. (1960) Biochemical aspects of rhythms: phase shifting by chemicals. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25, 131-145

HAUPT, W. (1977) Bewegungsphysiologie der Pflanzen (Thieme Verlag Stuttgart) pp. 103 ff

HELFERICH, F. (1959) Ionenaustauscher Bd. I (Verlag Chemie Weinheim/Bergstr.)

HOPE, A.B. (1971) Ion Transport and Membranes, a Biophysical Outline (Verlag Butterworth London)

KEEGSTRA, K., TALMADGE, K.W., BAUER, W.D., ALBERSHEIM, P. (1973) The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured Sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. Plant Physiol. 51, 188-196

KRIEGER, K.G. (1978) Early time course and specifity of auxin effects on turgor movement of the bean pulvinus. Planta 140, 107-109

LIN, W., HANSON, J.B. (1974) Increase in electrogenic membrane potential with washing of corn root tissue. Plant Physiol. 54, 799-801

MACKLON, A.E.S., HIGINBOTHAM, N. (1968) Potassium and nitrate uptake and cell transmembrane electropotential in excised pea epicotyls. Plant Physiol. 43, 888-892

MARRÈ, E., LADO, P., RASI-CALDOGNO, F., COLOMBO, R. (1973) Correlation between cell enlargement in pea internode segments and decrease in pH of the medium of incubation. I. Effects of fusicoccin, natural and synthetic auxins and mannitol. Plant Sci Lett. 1, 179-184

MARRÈ, E., LADO, P., FERRONI, A., BALLARIN DENTI, A. (1974 a) Transmembrane potential increase induced by auxin, benzyladenine and fusicoccin; correlation with proton extrusion and cell enlargement. Plant Sci. Lett. 2, 257-265

MARRÈ, E., LADO, P., RASI-CALDOGNO, F., COLOMBO, R., DE MICHELIS, M.I. (1974 b) Evidence for the coupling of proton extrusion to K^+ uptake in pea internode segments treated in fusicoccin or auxin. Plant Sci. Lett. 3, 365-379

MARTENS, J., HANSEN, U.-P., WARNCKE, J. (1979) Further evidence for the parallel pathway model of the metabolic control of the electrogenic pump in Nitella as obtained from the high frequency slope of the action of light. J. Membrane Biol. 48, 115-139

MASUDA, Y., OI, S., SATOMURA, Y. (1970) Further studies on the role of cell-wall-degrading enzymes in cell-wall loosening in oat coleoptiles. Plant & Cell Physiol. 11, 631-638

MAYER, W.-E. (1977) Kalium- und Chloridverteilung im Laminargelenk von Phaseolus coccineus L. während der circadianen Blattbewegung im tagesperiodischen Licht-Dunkelwechsel. Z. Pflanzenphysiol. 83, 127-135

MAYER, W.-E. (1981) Energy-dependent phases of the circadian clock-controlled leaf movement in Phaseolus coccineus L.. Planta 152, 292-301

MERTZ, S.M., HIGIBOTHAM, N. (1976) Transmembrane electropotential in barley roots as related to cell type, location, and cutting and aging effects. Plant Physiol. 57, 123-128

MORVAN, C., DEMARTY, M., THELLIER, M. (1979) Titration of isolated cell walls of Lemna minor L.. Plant Physiol. 63, 1117-1122

MUMMERT, H. (1979) Transportmechanismen für K^+, Na^+ und Cl^- in stationären und dynamischen Zuständen bei Acetabularia. Dissertation Universität Tübingen

NAKASHIMA, H. (1982) Effects of membrane ATPase inhibitors on light-induced phase shifting of the circadian clock in Neurospora crassa. Plant Physiol. 69, 619-623

NISHITANI, K., MASUDA, M. (1983) Auxin-induced changes in the cell wall xyloglucans: effects of auxin on the two subfractions of xyloglucans in the epicotyl cell wall of Vigna angularis. Plant & Cell Physiol. 24, 345-355

PALMER, J.H., ASPREY, G.F. (1958) Studies in the nyctinastic movement of the leaf pinnae of Samanea saman (Jacq) Merrill. I. A general description of the effect of light on the nyctinastic rhythm. Planta 51, 757-769

PITMAN, M.G. (1965) The location of the Donnan free space in disks of beetroot tissue. Aust. J. Biol. Sci. 18, 547-553

PITMAN, M.G., MERTZ, S.M., GRAVES, J.S., PIERCE, W.S., HIGINBOTHAM, N. (1970) Electrical potential differences in cells of barley roots and their relation to ion uptake. Plant Physiol. 47, 76-80

PITMAN, M.G., LÜTTGE, U., KRAMER, D., BALL, E. (1974) Free space characteristics of barley leaf slices. Aust. J. Plant Physiol. 1, 65-75

RACUSEN, R.H., SATTER, R.L. (1975) Rhythmic and phytochrom-regulated changes in transmembrane potential in Samanea pulvini. Nature 255, 408-410

RACUSEN, R.H., GALSTON, A.W. (1977) Electrical evidence for rhythmic changes in the cotransport of sucrose and hydrogen ions in Samanea pulvini. Planta 135, 57-62

RASCHKE, K. (1979) Movements of stomata. Physiology of Movements (Encycl. Plant Physiol. (NS) 7, eds. Haupt, W., Feinleib, M.E. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York) pp. 383-441

RAVEN, J.A., SMITH, F.A. (1980) The chemiosmotic viewpoint. Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues (Developments in Plant Biology 4, eds. Spanswick, R.M., Lucas, W.J., Dainty, J. Elsevier/North-Holland Biomedical Press Amsterdam, New York, Oxford) pp. 161-174

RAY, P.M. (1967) Radioautographic study of cell wall deposition in growing plant cells. J. Cell Biol. 35, 659-674

RAYLE, D.L. (1973) Auxin-induced hydrogen-ion secretion in Avena coleoptiles and its implications. Planta 114, 63-73

RAYLE, D.L., CLELAND, R. (1970) Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. Plant Physiol. 46, 250-253

RAYLE, D.L., CLELAND, R. (1972 a) The in-vitro acid-growth response: relation to in-vivo growth responses and auxin action. Planta 104, 282-296

RAYLE, D.L., CLELAND, R. (1972 b) Rapid growth responses in the Avena copeoptile: a comparison of the action of hydrogen ions, CO_2 and auxin. Plant Growth Substances 1970 (ed. Carr, D.J. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York) pp. 44-51

RAYLE, D.L., CLELAND, R.E. (1980) Evidence that auxin-induced growth of soybean hypocotyls involves proton excretion. Plant Physiol. 66, 433-437

RAYLE, D.L., HAUGHTON, P.M., CLELAND, R. (1970) An in vitro system that stimulates plant cell extension growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 1814-1817

RITCHIE, R.J., LARKUM, A.W.D. (1982) Cation exchange properties of the cell walls of Enteromorpha intestinalis. J. Exp. Bot. 33, 125-139

ROTTENBERG, H., GRUNWALD, T., AVRON, M. (1972) Determination of ΔpH in chloroplasts. 1. Distribution of ^{14}C-Methylamine. Eur. J. Biochem. 25, 54-63

SAFTNER, R.A., RASCHKE, K. (1981) Electrical potentials in stomatal complexes. Plant Physiol. 67, 1124-1132

SAMEJIMA, M., SIBAOKA, T. (1980) Changes in the extracellular ion concentration in the main pulvinus of Mimosa pudica during rapid movement and recovery. Plant & Cell Physiol. 21, 467-479

SANDERS, D., HANSEN, U.-P., SLAYMAN, C.L. (1981) Role of plasma membrane proton pump in pH regulation in non-animal cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5903-5907

SANDERS, D. (1983) Gradient coupled chloride transport in plant cells. Chloride Transport Coupling in Cells and Epithelia (ed. Gerencser, in press)

SATTER, R.L., APPLEWHITE, P.B., KREIS, D.J.Jr., GALSTON, A.W. (1973) Rhythmic leaf movement in Albizzia julibrissin: effects of electrolytes and temperature alteration. Plant Physiol. 52, 202-207

SATTER, R.L., GALSTON, A.W. (1981) Mechanisms of control of leaf movement. Ann. Rev. Plant Physiol. 32, 83-110

SATTER, R.L., GARBER, R.C., KHAIRALLAH, L., CHENG, Y.-S. (1982) Elemental analysis of freeze-dried thin sections of Samanea motor organs: barriers to ion diffusion through the apoplast. J. Cell Biol. 95, 893-902

SAXE, H., SATTER, R.L. (1979) Effect of vanadate on rhythmic leaf movement in Albizzia julibrissin. Plant Physiol. 64, 905-907

SCHAFHAUSER, W. (1982) Circadiane Änderungen des Wasserpotentials und Zellwandeigenschaften der Motorzellen des Laminargelenks von Phaseolus coccineus L.. Zulassungsarbeit Universität Tübingen

SCHNABL, W. (1980) Anion metabolism as correlated with the volume changes of guard cell protoplasts. Z. Naturforsch. 35 c, 621-626

SCHUBERT, M. (1982) Festionengehalt der Zellwände von Extensor, Flexor und Flanken des Laminargelenks von Phaseolus coccineus L.. Zulassungsarbeit Universität Tübingen

SCOTT, B.I.H., GULLINE, H.F., ROBINSON, G.R. (1977) Circadian electrochemical changes in the pulvinules of Trifolium repens. Aust. J. Plant Physiol. 4, 193-206

SENTENAC, H., GRIGNON, C. (1981) A model for predicting ionic equilibrium concentrations in cell walls. Plant Physiol. 68, 415-419

SKROVE, D., RINNAN, T., JOHNSSON, A. (1982) Effect of abscisic acid on the circadian leaf movements of Oxalis regnellii. Physiol. Plant. 55, 221-225

SOLL, H., BÖTTGER, M. (1982 a) The mechanism of proton-induced increase of cell wall extensibility. Plant Sci. Lett. 24, 163-171

SOLL, H., BÖTTGER, M. (1982 b) Poster 387 Botaniker Tagung Freiburg

SPANSWICK, R.M. (1981) Electrogenic pumps. Ann. Rev. Plant Physiol. 32, 267-289

STARRACH, N., FREUDLING, C., MAYER, W.-E., GRADMANN, D. (1983) "Aged" preparations represent intact tissue better than freshly excised ones. Planta (in press)

STEINHEIL, W. (1969) Versuche zur Abhängigkeit der circadianen Rhythmik von der Atmungsenergie bei Kalanchoe blossfeldiana. Dissertation Universität Tübingen

TAGAWA, T., BONNER, J. (1957) Mechanical properties of the Avena coleoptile as related to auxin and to ionic interactions. Plant Physiol. 32, 207-212

VAN STEVENINCK, R.F.M. (1975) The "washing" or "aging" phenomemon in plant tissues. Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 237-258

WALKER, N.A., PITMAN, M.G. (1976) Measurement of fluxes across membranes. Transport in Plants. II, Part A Cells (Encycl. Plant Physiol. (NS) 2, eds. Lüttge, U., Pitman, M.G. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York) pp. 93-126

WANNER, K. (1982) Die Wirkung von Kaliumchlorid-Pulsen auf die circadiane Uhr von Phaseolus coccineus L.. Zulassungsarbeit Universität Tübingen

ZEIGER, E. (1983) The biology of stomatal guard cells. Ann. Rev. Plant Physiol. 34, 441-475

ZIMMERMANN, H.J., KAHL, G. (1982) Wundheilung in höheren Pflanzen. BIUZ 12, 49-58

ZIMMERMANN, U., PILWAT, G. (1971) Untersuchungen über den Kaliumtransport in E. coli B. I. Einfluß von Ammoniumchlorid und der essentiellen Aminosäuren Histidin und Leucin auf die stationäre Kaliumverteilung in E. coli B 525. Z. Naturforsch. 26 b, 887-893

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:
Adam, Bachmair, Beck, Bentrup, Boehm, Dahmen, Dauber,
Dietz, Engelmann, Frey, Gollnick, Gradmann, Huisgen,
Hurka, Kemmler-Sack, Lorenz, Machemer, Mayer, Mickoleit,
Nöth, Oberwinkler, Renz, Schwemmle, Seitz, Seitz, Stegmann,
Strähle, Varju, Voitländer, Weiß, Wörz.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Gradmann, der mich zu dieser Doktorarbeit angeregt hat und der mich trotz der Entfernung zuverlässig und kritisch unterstützt und angeleitet hat. Ihm und seiner Frau Waltraud Gradmann danke ich herzlich für ihre Freundschaft.

Herrn Dr. Mayer danke ich sehr für die Überlassung des Themas und für die finanzielle Unterstützung. Wir lernten, gut, oft und heftig miteinander zu diskutieren. Es war manchmal nicht leicht, zwischen den zwei Welten Biophysik und Biorhythmik zu stehen.

Herrn Prof. Dr. Bentrup und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe danke ich, daß ich bis Ende 1981 zu ihnen gehören konnte.

Frau Doris Flach und Herrn Siegfried Lelke danke ich herzlich, daß sie immer Bohnenpflanzen großgezogen haben.

Frau Christiane Weiß und Herrn Dr. Hewers danke ich für die Ausarbeitung des Computerprogramms, mit dem die Effluxdaten analysiert wurden.

Schließlich verdanke ich es einem Großpraktikum, daß ich über Jahre meine Bekannten und Freunde in der Biokybernetik gehabt habe.

Ich bin froh, als Studentin durch BAFÖG die notwendige Förderung erhalten zu haben.

Lebenslauf

Maria Crescentia Freudling, geboren am 14.10.1950 in Frauenzell als Tochter des Zimmermanns Jakob Freudling und der Hebamme Leopoldine Freudling, geb. Koch.

Schulen	1957-1962 Volksschule in Frauenzell
	1962-1968 Gymnasium am Anger in München
	1968-1971 Carl von Linde Gymnasium in Kempten/Allgäu (humanistischer Zweig); dort im Juni 1971 Reifeprüfung
Studium	1971-1973 vier Semester Diplomchemiestudium an der Universität in München
	1973-1977 acht Semester Studium der Chemie und Biologie an der Universität in Tübingen; mit Staatsexamina in Biologie und Chemie abgeschlossen; Anfertigung der Zulassungsarbeit "Elektrische Übertragungseigenschaften und Kompartimentierung bei Acetabularia" bei Herrn Dr. Gradmann am Institut für Biologie I, Universität Tübingen
Beschäftigung	von Dez.1977-Nov.1978 und von Juli 1979-Juni 1982 wissenschaftliche Angestellte (DFG) bei Herrn Dr. Mayer am Institut für Biologie I, Universität Tübingen ("Biologie der Zeitmessung, Physiologie der Blattbewegung")
Dissertation	von Juli 1979-Dez.1983 Arbeit an der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie I, Universität Tübingen, unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. Gradmann, MPI für Biochemie in Martinsried.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353